

**Cryo-Elektronenmikroskopie- und Kristallstruktur der
F₄₂₀-reduzierenden [NiFe]-Hydrogenase (FrhABG) aus
*Methanothermobacter marburgensis***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat)

dem Fachbereich Biologie der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Stella Vitt
Diplom Biologin

aus Siegen

Marburg/Lahn 2013

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden in dem Zeitraum von Oktober 2009 bis Juli 2012 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg/Lahn unter der Leitung von Ph.D. Seigo Shima, in der Abteilung von Prof. Dr. Rudolf K. Thauer und in Zusammenarbeit mit Priv. Doz. Dr. Ulrich Ermler am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt am Main durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität in Marburg als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter: Ph.D. Seigo Shima

Zweitgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Buckel

Tag der mündlichen Prüfung: 19. April 2013

Die in der Doktorarbeit beschriebenen Ergebnisse wurden in zwei Übersichtsartikeln integriert.

1. **Mills DJ***, **Vitt S***, Strauss M, Shima S, Vonck J (2013) De novo modeling of the F₄₂₀-reducing [NiFe]-hydrogenase from a methanogenic archaeon by cryo-electron microscopy. eLife 2: e00218.
2. **Vitt S**, ..., Shima S und Ermler U (2013) X-ray structure of the F₄₂₀-reducing [NiFe]-hydrogenase from the methanogenic archaeon *Methanothermobacter marburgensis*. In preparation.

* Diese beiden Autoren haben sich im gleichen Maße eingebracht

Für meine Familie

*„Im Leben muss man nichts fürchten,
man kann alles begreifen.“*
(Marie Curie)

Inhalt

Inhalt	i
Abkürzungsverzeichnis.....	iii
Zusammenfassung.....	v
1 Einleitung.....	1
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Kultivierung von Mikroorganismen.....	13
2.1.1 <i>Methanothermobacter marburgensis</i>	13
2.1.2 <i>Escherichia coli</i>	13
2.2 Klonierung des <i>frhB</i>-Gens aus <i>Methanocaldococcus jannaschii</i>.....	14
2.2.1 Extraktion und Reinigung genomischer DNS	14
2.2.2 Klonierung des <i>frhB</i> -Gens aus <i>M. jannaschii</i>	14
2.3 Überexpression des <i>frhB</i>-Gens in <i>E. coli</i>	15
2.4 Aufreinigung von nativer FrhABG und heterolog produzierter FrhB	15
2.4.1 FrhABG-Komplex aus <i>M. marburgensis</i>	16
2.4.2 FrhB aus <i>E. coli</i>	17
2.5 Isolierung von Coenzym F₄₂₀	17
2.6 Bestimmung der FrhABG und FrhB Eigenschaften	18
2.6.1 Apparente molekulare Masse	18
2.6.2 Bestimmung von Nicht-Häm-Eisen.....	19
2.6.3 Katalytische Eigenschaften.....	19
2.6.4 Redoxtitration von FrhABG und FrhB	20
2.7 Einzelpartikel Cryo-Elektronenmikroskopie.....	22
2.7.1 Cryo-EM Elektronendichte Rekonstruktion und Prozessierung	24
2.7.2 Modellbau.....	25
2.7.3 Graphische Darstellung	25
2.8 Kristallographie.....	25
2.8.1 Kristallisation und Substrattränkung	31
2.8.2 Datensammlung und Datenreduktion	32
2.8.3 Zwillings-Faktor des Kristalles	32
2.8.4 Lösung des Phasenproblems.....	33
2.8.5 Modellbau und Verfeinerung.....	33
2.8.6 Graphische Darstellung	34
3 Ergebnisse	35
3.1 Aufreinigung und kinetische Eigenschaften von FrhABG.....	35
3.2 Einzelpartikel Cryo-EM Struktur von FrhABG	42
3.2.1 FrhABG Komplex	42
3.2.2 FrhA	45

3.2.3	FrhG	48
3.2.4	FrhB	50
3.3	Kristallstruktur von FrhABG.....	54
3.3.1	Strukturlösung des FrhABG Komplexes	54
3.3.2	FrhA	57
3.3.3	FrhG	62
3.3.4	FrhB	67
3.3.5	FrhABG Komplex	71
3.3.6	Katalytische Reaktionen	74
3.4	FrhB als F₄₂₀-bindende Untereinheit	80
3.4.1	Heterologe Produktion und Aufreinigung von FrhB	80
3.4.2	F ₄₂₀ -oxidierende Aktivität und katalytische Eigenschaften von FrhB	81
4	Diskussion	84
5	Ausblick	101
6	Literaturverzeichnis.....	103
	Danksagung	111
	Lebenslauf.....	112
	Erklärung	113

Abkürzungsverzeichnis

[4Fe4S]-Cluster	vier Eisen vier Schwefel Cluster
Å	Ångström
ad	aufgefüllt zu
AU	absorption units (Absorptionseinheit)
BV	Benzylviologen
CO	Kohlenstoffmonoxid
CN⁻	Cyanid-Ion
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ESR	Elektronenspinresonanz
ε	Extinktionskoeffizient
F₃₉₀	8-hydroxyguanyliertes bzw. 8-hydroxyadenyliertes Coenzym F ₄₂₀
F₄₂₀	<i>N</i> -(<i>N</i> - <i>L</i> -Lactyl- γ - <i>L</i> -Glutamyl)- <i>L</i> -Glutamat-Phosphodiester-Derivat von 7,8-Didemethyl-8-Hydroxy-5-Deazariboflavin-5'-Phosphat, Coenzym F ₄₂₀
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FrhABG	F ₄₂₀ -reduzierende [NiFe]-Hydrogenase mit den Untereinheiten A, B und G
H₄MPT	5,6,7,8-Tetrahydromethanopterin
g	Erdbeschleunigung
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare (1000 Basenpaare)
kDa	Kilodalton (1000 Dalton)
M	Molar (mol/l)
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption/ionization - time of flight
min	Minuten

MES	2-(<i>N</i> -Morpholino) Ethansulfonsäure
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
[NiFe]-Zentrum	Nickel-Eisen-Zentrum
OD₆₀₀	Optische Dichte (bei 600 nm)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
PEE	Pentaerythritolethoxylat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLS	Swiss Light Source (Synchrotron, Villigen, Schweiz)
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- <i>p</i> -ethylendiamid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (μmol umgesetztes Substrat pro Minute)

Zusammenfassung

Die Methanbildung aus H_2 und CO_2 ist die einzige Energie-liefernde Reaktion in vielen methanogenen Archaeen. Pro Mol gebildetem Methan werden vier Mol H_2 verbraucht. Der Wasserstoff wird dabei durch Hydrogenasen aktiviert, wovon es in den meisten hydrogenotrophen Methanbildnern drei unterschiedliche [NiFe]-Hydrogenasen und eine [Fe]-Hydrogenase gibt. Zu den [NiFe]-Hydrogenasen gehören die cytoplasmatische F_{420} -reduzierende [NiFe]-Hydrogenase FrhABG, eine oder mehrere Membran-assoziierte Ferredoxin-reduzierende [NiFe]-Hydrogenasen vom EhaA-Q Typ und eine Heterodisulfid Reduktase-reduzierende [NiFe]-Hydrogenase (MvhADG). Von den vier Hydrogenasen ist die F_{420} -reduzierende [NiFe]-Hydrogenase die quantitativ wichtigste, da sie über reduziertes $F_{420}H_2$ vier der acht zur CO_2 Reduktion benötigten Reduktionsäquivalente bereitstellt. F_{420} ist ein 5'-Deazaflavinderivat, das zwar strukturell einem Flavin ähnelt, sich aber funktionell wie ein Pyridinnukleotid verhält, in dem es ein Hydrid und nicht einzelne Elektronen übertragen kann. Das Redoxpotential E_o' von F_{420} ist mit -360 mV aber um 40 mV negativer als das von NAD und NADP. Die Reduktion von F_{420} mit H_2 ($E_o' = -414$ mV) erfolgt daher auch nahe am thermodynamischen Gleichgewicht, insbesondere unter physiologischen Bedingungen, unter denen der H_2 -Partialdruck in Kulturen von methanogenen Archaeen sehr viel niedriger als ein Bar ist. Die funktionelle Reversibilität spiegelt sich auch in dem Befund wieder, dass methanogene Archaeen, die auf Formiat wachsen können und eine F_{420} -abhängige Formiat-Dehydrogenase enthalten, die Reoxidation von $F_{420}H_2$ mittels der F_{420} -reduzierenden [NiFe]-Hydrogenase katalysieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Struktur von FrhABG aufzuklären, wofür es eine Reihe unterschiedlicher Motive gab. Zum einen ist es die funktionelle Reversibilität, die dieses Enzym von allen bisher strukturell untersuchten Hydrogenasen unterscheidet. Zum anderen gehört FrhABG zur phylogenetischen Gruppe 3 [NiFe]-Hydrogenasen, von denen es noch keine Strukturen gibt; alle bisher strukturell aufgeklärten [NiFe]-Hydrogenasen gehören der Gruppe 1 an. Und letztlich, weil der FrhABG Komplex die Untereinheit B enthält, die phylogenetisch verwandt ist mit Untereinheiten, die in anderen F_{420} -abhängigen Enzymen vorkommen wie in den F_{420} -abhängigen Formiat-Dehydrogenase, F_{420} -abhängigen Glutamat-Synthase, F_{420} -abhängigen Sulfid-Reduktase, den $F_{420}H_2$:Quinon-Oxidoreduktase und $F_{420}H_2$:Phenazin-Oxidoreduktase Komplexen, von denen es ebenfalls noch keine Strukturen gibt.

Der F_{420} -reduzierende FrhABG Komplex wurde aus *Methanothermobacter marburgensis* gereinigt. Das Enzym aus diesem thermophilen Archaeon wurde ausgewählt, da *M. marburgensis* auf H_2 und CO_2 mit Verdopplungszeiten von 2 Stunden zu sehr hohen Zelldichten heranwächst und Zellextrakt dieses Organismus die Reduktion von F_{420} mit H_2 mit hohen spezifischen Aktivitäten von 2,8 U/mg katalysiert. Nach 100-facher Anreicherung wurde eine homogene Präparation mit einer spezifischen Aktivität von 280 U/mg und einem apparenten K_m für F_{420} von 40 μM erhalten. Die Präparation mit einer apparenten Molmasse von über 1000 kDa enthielt die drei Untereinheiten A, B und G im

Verhältnis 1 zu 1 zu 1. Der multimere Komplex aus Heterotrimeren ist so groß, dass er bei Ultrazentrifugation sedimentiert. Die makromolekulare Struktur von FrhABG legte es nahe, den multimeren Komplex zunächst Cryo-elektronenmikroskopisch zu charakterisieren, was mit einer einmaligen Auflösung bis $\sim 4 \text{ \AA}$ gelang. Auf Grund der hohen Auflösung war es möglich, das Kohlenstoffrückrad in die Elektronendichte zu modellieren. Das Heterotrimer bildet einen $(\text{FrhABG})_{12}$ Komplex mit einer molekularen Masse von etwa 1215 kDa. Dabei werden die Trimerisierung und die Multimerisierung hauptsächlich über Salzbrücken stabilisiert. Die Struktur lässt die Präsenz eines $[\text{NiFe}]$ -Zentrums in FrhA, von drei $[\text{4Fe4S}]$ -Clustern in FrhG und schließlich von einem $[\text{4Fe4S}]$ -Cluster und einem FAD in FrhB erahnen.

Parallel zu den Cryo-elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden Kristallisationsversuche von FrhABG durchgeführt, die zu inhomogenen Kristallen mit Zwillings-Eigenschaften führten. Eine Phasenlösung allein durch den sogenannten anormalen Datensatz, der an der Eisenkante gemessen wurde, war wegen der schlechten Qualität nicht möglich. Erst eine Kombination dieser Phasen mit denjenigen des Cryo-EM Modells lösten das Phasenproblem und damit die Kristallstruktur. Die Kristallstruktur konnte bis zu einer Auflösung von 1.8 \AA verfeinert werden, was eine exakte Analyse insbesondere der Metallzentren erlaubte. In der Kristallstruktur ist das $[\text{NiFe}]$ -Zentrum in der FrhA Untereinheit viel deutlicher zu erkennen als in der Cryo-EM Struktur. Das Nickelatom wird durch vier Cystein-Thiolate koordiniert, wobei zwei dieser Thiolate zusätzlich eine Brücke zu dem Eisenatom bilden. Weiter ist zu erkennen, dass das Eisen drei diatomische Liganden trägt, sehr wahrscheinlich ein CO und zwei CN^- . Trotz des hohen Konservierungsgrads des aktiven $[\text{NiFe}]$ -Zentrums, gibt es in seiner Umgebung ein paar markante Aminosäureaustausche, die unsere Vorstellung über Hydrogenasen erweitern. In der FrhG Untereinheit mit drei $[\text{4Fe4S}]$ -Clustern weist das proximale $[\text{4Fe4S}]$ -Cluster eine ungewöhnliche, in anderen $[\text{NiFe}]$ -Hydrogenasen noch nicht beschriebene Koordinierung mit einem Aspartat anstelle eines Cysteins auf. Ebenfalls ungewöhnlich ist, dass der mediale Cluster ein $[\text{4Fe4S}]$ - und nicht ein $[\text{3Fe4S}]$ -Cluster ist und dass der mediale und distale $[\text{4Fe4S}]$ -Cluster in eine Ferredoxin-ähnliche Struktur eingebettet sind. In der FrhB Untereinheit sind das $[\text{4Fe4S}]$ -Cluster und das FAD, welches eine ungewöhnlich gestauchte Konformation aufweist, gut aufgelöst. Die Distanz zwischen dem $[\text{4Fe4S}]$ -Cluster und dem FAD liegt bei $7,5 \text{ \AA}$. FAD ist so angeordnet, dass es in van-der-Waals-Kontakt zu F_{420} kommt und ein Hydrid von F_{420}H_2 von der pro-S-Position akzeptieren kann, was aus Modellierungen hervorgeht.

Um zu zeigen, dass FrhB tatsächlich die Untereinheit ist, an der F_{420} reduziert wird, wurde das Gen *frhB* aus *Methanocaldococcus jannaschii* in *Escherichia coli* überproduziert, gereinigt und charakterisiert. Die heterolog produzierte Untereinheit hatte eine molekulare Masse von etwa 31 kDa und enthielt sowohl FAD und als auch ein Eisen-Schwefel-Cluster. Das rekombinante Enzym katalysierte die Oxidation von F_{420}H_2 mit Benzylviologen als Elektronenakzeptor mit einer spezifischen Aktivität von 15 U/mg Protein , verlor aber seine Aktivität schnell, insbesondere beim Einfrieren. Diese und vorläufige Elektronenspinresonanz-spektroskopische Untersuchungen zum Redoxpotential der einzelnen $[\text{4Fe4S}]$ -Cluster werden in Kapitel 3 der vorliegenden Arbeit beschrieben.

1 Einleitung

Die Methanbildung aus H_2 und CO_2 sowie aus Essigsäure ist ein wichtiger Schritt im Kohlenstoffkreislauf, wenn Biomasse in anoxische Bereiche gerät, in denen neben O_2 auch Elektronenakzeptoren wie Nitrat, Mn^{IV} , Fe^{III} , und Sulfat fehlen. Die Methanbildung wird durch anaerobe Mikroorganismen katalysiert, die ausschließlich zur Domäne der Archaea und in dieser zum Reich der Euryarchaeota gehören. Methanogene Archaeen leben in Süßwassersedimenten, in Sümpfen, im Faulturm von Kläranlagen aber auch im Pansen von Wiederkäuern und dem Verdauungstrakt von Termiten und produzieren in diesen anaeroben Biotopen zusammen jährlich bis zu einer Milliarde Tonnen Methan, von dem etwa die Hälfte in die Atmosphäre gelangt, wo es als Treibhausgas wirkt. Etwa 1% des Kohlenstoffkreislaufs durchläuft Methan als Zwischenprodukt (Thauer et al. 2008).

Methanogene Archaeen gliedern sich in sechs Ordnungen, von denen die Ordnungen der *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanopyrales* und *Methanomicrobiales* keine Cytochrome enthalten und auf Wachstum auf H_2 und CO_2 spezialisiert sind. Einige Spezies können zusätzlich auch Formiat als methanogenes Substrat verwenden. Die fünfte Ordnung ist die der *Methanosarcinales*, deren Vertreter alle Cytochrome und wahrscheinlich auch Methanophenazin enthalten und sich auf den Wachstum auf Essigsäure und/oder Methanol und Methylamine spezialisiert haben. Nur wenige Spezies können zusätzlich noch auf H_2 und CO_2 wachsen. Aus der Ordnung der *Methanosarcinales* scheint sich die Ordnung der *Methanocellales* entwickelt zu haben, deren Vertreter noch Cytochrome enthalten, die aber die Fähigkeit verloren haben, auf Essigsäure, Methanol und Methylaminen wachsen zu können. So ist das Wachstum des bisher einzig charakterisierten Organismus aus dieser Ordnung - *Methanocella paludicola* ord. nov. (ein Isolat aus Rice Cluster I) - auf H_2 und CO_2 sowie auf Formiat als Energiequelle beschränkt (Sakai et al. 2011). Mit Ausnahme von einigen Vertretern der *Methanosarcinales*, wie z.B. *Methanosaeta thermophila* (Welte und Deppenmeier 2011), ist allen methanogenen Archaeen gemein, dass sie über eine F_{420} -reduzierende [NiFe]-Hydrogenase (FrhABG) verfügen, so auch *Methanothermobacter marburgensis*, aus dem das Enzym isoliert wurde, dessen Struktur Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist.

M. marburgensis ist ein thermophiles Archaeon, das zur Ordnung der *Methanobacteriales* gehört und das mit einem Wachstumstemperaturoptimum von 65°C mit H_2 und CO_2 als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle mit Verdoppelungszeiten unter zwei Stunden wächst. Es werden Zelldichten von über 2 g (Trockengewicht) pro Liter erreicht, was für methanogene Archaeen einmalig ist. Das ist der Hauptgrund, warum die Biochemie der Methanbildung aus vier H_2 und CO_2 , die im Folgenden kurz beschrieben wird, in diesem Organismus und dem nahe verwandten *Methanothermobacter thermoautotrophicus* aufgeklärt worden ist.

Funktion der F_{420} -reduzierenden [NiFe]-Hydrogenase im Stoffwechsel

Im ersten Schritt der Methanbildung aus CO_2 und H_2 wird CO_2 mit reduziertem Ferredoxin auf die Stufe einer Formylgruppe reduziert und an Methanofuran gebunden. Diese Formylgruppe wird anschließend auf den Stickstoff N^5 von Tetrahydromethanopterin (H_4MPT) übertragen und stufenweise zu N^5 -Methyl- H_4MPT unter Beteiligung einer cytoplasmatischen F_{420} -abhängigen Methylen- H_4MPT Dehydrogenase (Mtd) und einer cytoplasmatischen F_{420} -abhängigen Methylen- H_4MPT -Reduktase (Mer) reduziert. Die Methylgruppe wird anschließend von H_4MPT auf Coenzym M (HS-CoM) übertragen, eine Natriumionen-abhängige Reaktion, die von einem Membran-gebundenen Enzymkomplex katalysiert wird (MtrA-H). Im letzten Schritt bewirkt eine cytoplasmatische Methyl-Coenzym M-Reduktase (McrABG) die Reduktion von $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$ mit Coenzym B (HS-CoB) zu Methan und dem Heterodisulfid CoM-S-S-CoB (Abbildung 1). Der erste und der letzte Reduktionsschritt der CO_2 -Reduktion zu Methan sind miteinander über Ferredoxin verbunden. Das in der Reduktion von CO_2 zu Formylmethanofuran benötigte reduzierte Ferredoxin wird nämlich bei der Reduktion von CoM-S-S-CoB mit H_2 regeneriert. An der Katalyse der Reaktion ist ein cytoplasmatischer [NiFe]-Hydrogenase/Heterodisulfid-Reduktase Komplexes (MvhADG/HdrABC) beteiligt, der die endergone Reduktion von Ferredoxin mit H_2 an die exergone Reduktion von CoM-S-S-CoB mit H_2 durch Flavin-basierte Elektronenbifurkation koppelt (Kaster et al. 2011b).

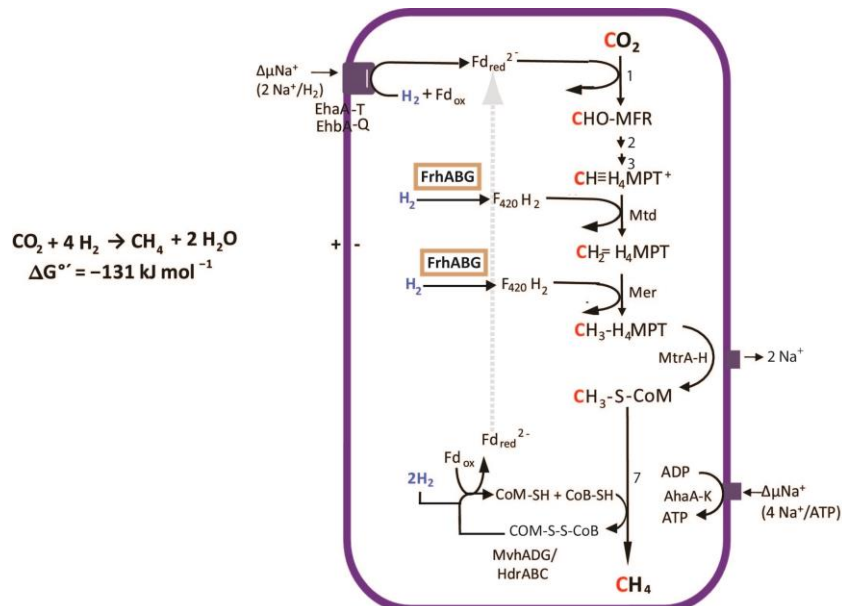


Abbildung 1: Schema des Stoffwechsels von CO_2 und H_2 zu CH_4 in *M. marburgensis*. $F_{420}\text{H}_2$, reduziertes Coenzym F_{420} ; FrhABG, F_{420} -reduzierende [NiFe]-Hydrogenase; EhaA-T/EhbA-Q, Energiekonvertierende Hydrogenasen; MvhADG/HdrABC, Methylviologen-reduzierende [NiFe]-Hydrogenase/Heterodisulfid-Reduktase Komplex; Fd, Ferredoxin; MFR, Methanofuran; H_4MPT , Tetrahydromethanopterin; CHO-MFR, Formyl-MFR; $\text{CH}\equiv\text{H}_4\text{MPT}^+$, Methenyl- H_4MPT^+ ; $\text{CH}_2=\text{H}_4\text{MPT}$, Methylen- H_4MPT ; $\text{CH}_3\text{-H}_4\text{MPT}$, Methyl- H_4MPT ; CoM-S-S-CoB, Heterodisulfid; Mer, Methylen- H_4MPT -Reduktase; Mtd, Methylen- H_4MPT -Dehydrogenase; (1) Formyl-MFR-Dehydrogenase; (2) Formyl-MFR: H_4MPT -Formyltransferase; (3) Methenyl- H_4MPT -Cyclohydrolase; Mtd, Methylen- H_4MPT -Dehydrogenase; Mer, Methylen- H_4MPT -Reduktase; MtrA-H, Methyl- H_4MPT : Coenzym M Methyltransferase; (7) Methyl-Coenzym M-Reduktase (Thauer et al. 2010).

Ferredoxin wird zusätzlich mit H_2 unter Beteiligung eines Energie-konservierenden Membran-assoziierten [NiFe]-Hydrogenase Komplexes reduziert, was immer dann notwendig ist, wenn die Kopplung der CoM-S-S-CoB und Ferredoxin Reduktion mit zwei H_2 nicht 1 zu 1 zu 2 ist und wenn reduziertes Ferredoxin in Biosynthese-Reaktionen benötigt wird (Abbildung 1).

Im zweiten und dritten Reduktionsschritt wird reduziertes Coenzym F_{420} benötigt. F_{420} ist ein 5'-Deazaflavinderivat, das zwar strukturell einem Flavin ähnelt, sich aber funktionell wie ein Pyridinnukleotid verhält, in dem es ein Hydrid und nicht einzelne Elektronen übertragen kann (Abbildung 2). Das Redoxpotential E_o' von F_{420} ist mit -360 mV aber um 40 mV negativer als das von NAD und NADP. Die Regeneration von reduziertem F_{420} erfolgt durch Reduktion mit H_2 , katalysiert durch den cytoplasmatischen F_{420} -reduzierenden FrhABG Komplex (Abbildung 1). Der Hydridtransfer des F_{420} erfolgt stereospezifisch in die pro-S-Position bzw. davon weg (Yamazaki et al. 1985). Dies wurde für alle charakterisierten F_{420} -abhängigen Enzyme gezeigt (Thauer 1998). Das C5-Atom des Deazaflavin-Ringes ist dem C4-Atom der Pyridinnukleotide äquivalent. Jedoch erfolgt der Hydridtransfer der Pyridinnukleotid-abhängigen Enzyme spezifisch entweder in die pro-S- oder in die pro-R-Position (You 1985). Die pro-S Stereospezifität aller F_{420} -abhängigen Enzyme ist noch nicht verstanden, zumal Flavoproteine bekannt sind, die anstelle von FAD synthetisches 8-Hydroxy-5-Deaza-FAD binden können, und - abhängig vom untersuchten Enzym - die Reduktion dieses Deazaflavins entweder Re-Seiten-spezifisch oder Si-Seiten-spezifisch katalysieren (Sumner und Matthews 1992).

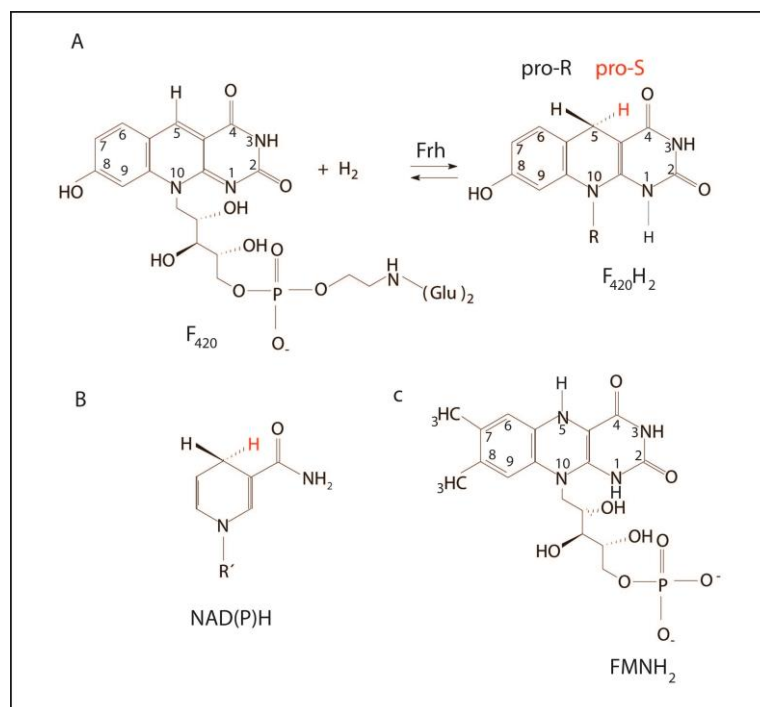


Abbildung 2: Struktur der oxidierten und reduzierten Formen von Coenzym F_{420} (A) und von NAD(P) (B) und von reduziertem FMN (C). Gezeigt ist die Aufsicht auf die Re-Seite der Cofaktoren. Die pro-S-Position an C5 von Coenzym F_{420} und an C4 von NAD(P) ist rot hervorgehoben. Coenzym F_{420} besteht aus einem Deazaflavin-Ring (Isoalloxazin Ring), einem Ribitol-, einem Phosphat-, einem Laktat- und zwei oder mehreren Glutamat-Anteilen (Eirich et al. 1978).

Über den FrhABG Komplex werden vier der acht zur CO₂-Reduktion benötigten Reduktionsäquivalente bereitgestellt. Damit ist dieses Nickel-Eisen-Enzym die quantitativ wichtigste Hydrogenase in der Methanbildung aus CO₂ und H₂. Das spiegelt sich auch in dem Befund wider, dass der Komplex etwa 1% der cytoplasmatischen Proteine von Methanogenen ausmacht. Bei Wachstum von *M. marburgensis* unter Nickel-limitierenden Bedingungen wird der FrhABG Komplex durch die [Fe]-Hydrogenase Methylen-H₄MPT-Dehydrogenase (Hmd) ersetzt, die dann zusammen mit der Mtd die Reduktion von F₄₂₀ mit H₂ katalysiert (Afting et al. 1998).

In *M. marburgensis* ist die Funktion des FrhABG Komplexes, die Reduktion von F_{420} mit H_2 zu katalysieren: $H_2 + F_{420} \rightleftharpoons F_{420}H_2$ ($\Delta G^{\circ'} = -10 \text{ kJ/mol}$). Aus der nur geringfügigen Änderung der freien Energie unter Standardbedingungen lässt sich bereits erkennen, dass die Reaktion auch in umgekehrter Richtung erfolgen kann, insbesondere, wenn der H_2 -Partialdruck nicht wie unter Standardbedingungen ein Bar (10^5 Pa) beträgt, sonder unter *in vivo* Bedingungen nur 10^3 Pa oder niedriger ist. Und tatsächlich gibt es Organismen, in denen der FrhABG Komplex physiologisch die Bildung von H_2 aus $F_{420}H_2$ katalysiert.

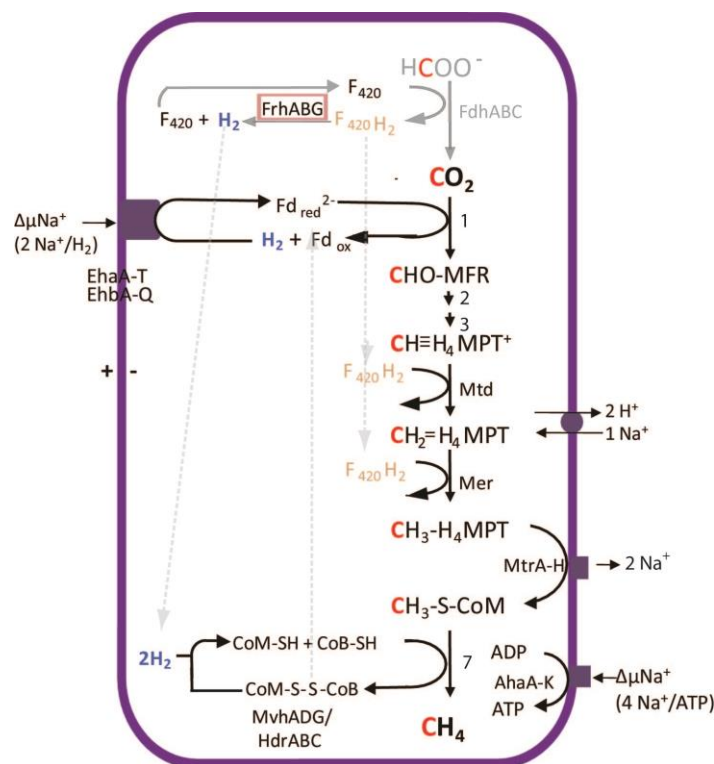


Abbildung 3: Schema des Stoffwechsels von Formiat zu CO₂ und Methan in *Methanobacterium formicicum*. F₄₂₀H₂, reduziertes Coenzym F₄₂₀; FrhABG, F₄₂₀-reduzierende [NiFe]-Hydrogenase; EhaA-T/EhbA-Q, Energie-konvertierende Hydrogenasen; MvhADG/HdrABC, Methylviologen-reduzierende [NiFe]-Hydrogenase/Heterodisulfid-Reduktase Komplex; Fd, Ferredoxin; MFR, Methanofuran; H₄MPT, Tetrahydromethanopterin; CHO-MFR, Formyl-MFR; CH≡H₄MPT⁺, Methenyl-H₄MPT⁺; CH₂=H₄MPT, Methylen-H₄MPT; CH₃-H₄MPT, Methyl-H₄MPT; CoM-S-S-CoB, Heterodisulfid; Mer, Methylen-H₄MPT-Reduktase; Mtd, Methylen-H₄MPT-Dehydrogenase; (1) Formyl-MFR-Dehydrogenase; (2) Formyl-MFR: H₄MPT-Formyltransferase; (3) Methenyl-H₄MPT-Cyclohydrolase; Mtd, Methylen-H₄MPT-Dehydrogenase; Mer, Methylen-H₄MPT-Reduktase; MtrA-H, Methyl-H₄MPT: Coenzym M-Methyltransferase; (7) Methyl-Coenzym M-Reduktase (Thauer et al. 2010).

Das ist z.B. der Fall, wenn methanogene Archaeen auf Formiat wachsen, das im ersten Schritt über eine F_{420} -abhängige Formiat Dehydrogenase (FdhABC) zu CO_2 oxidiert wird. Das anfallende $F_{420}H_2$ wird nachfolgend zu 50% unter Bildung von H_2 re-oxidiert, da dieses zur Reduktion von CoM-S-S-CoB und von Ferredoxin über den MvhADG/HdrABC Komplex benötigt wird (Abbildung 3).

Aufbau der F_{420} -reduzierenden [NiFe]-Hydrogenase (FrhABG)

Erstmals wurde FrhABG 1982 aus *M. thermoautotrophicum* unter aeroben Bedingungen angereichert und als oligomerer Enzymkomplex mit einer molekularen Masse von >500 kDa charakterisiert. Dieser Enzymkomplex bestand aus drei sogenannten Pentameren (170 kDa), jedes war aus drei Untereinheiten mit molekularen Massen von 40 kDa (FrhA), 31 kDa (FrhB) und 26 kDa (FrhG), in einem Verhältnis 2 zu 2 zu 1 zusammengesetzt (Jacobson et al. 1982b). Metall- und Flavinanalysen ergaben, dass das Pentamer 33-43 Mol Eisen, 24-30 Mol säurelabilen Schwefel, 2,5-3,1 Mol Nickel und 2,3 Mol FAD enthielt (Kojima et al. 1983). Bei späteren Proteinpräparationen sollte sich herausstellen, dass die Untereinheiten des FrhABG Komplexes eher in einem Verhältnis 8 zu 8 zu 8 bzw. 9 zu 9 zu 9 vorliegen (Fox et al. 1987; Baron und Ferry 1989b). Der FrhABG Komplex wurde nicht nur in *Methanobacter formicicum* (Baron et al. 1987), sondern auch in *Methanosarcina barkeri* Stamm Fusaro (Lunsdorf et al. 1991) als membranständig beschrieben. Immunogold markierte Ultradünnschnitte von *M. barkeri* zeigten eine Lokalisation des FrhABG Komplexes assoziiert mit der Membran von der Cytoplasma-Seite her. Die Membran-Assoziation wurde als Membranverankerung gesehen (Braks et al. 1994). Die Primärstruktur des FrhABG Komplexes weist jedoch keine transmembranen Helices auf, die auf eine Membranverankerung hindeuten könnten. Am Anfang dieser Arbeit wurde daher davon ausgegangen, dass es sich bei dem FrhABG Komplex um einen makromolekularen Komplex handelt, der aufgrund seiner molekularen Masse bei Ultrazentrifugation sedimentiert, was sich auch als richtig herausgestellt hat.

Aufgrund der Genomsequenz weiß man inzwischen, dass in den meisten methanogenen Archaeen, wie in *M. marburgensis*, der FrhABG Komplex von der transkriptionellen Einheit *frhADGB* kodiert wird (Alex et al. 1990b; Kaster et al. 2011a). Dabei kodiert *frhA* für die sogenannte große Untereinheit FrhA (43 kDa) mit dem [NiFe]-Zentrum, an dem H_2 oxidiert wird. Das vermutet man, da FrhA Sequenzähnlichkeiten mit [NiFe]-Zentrum tragenden Untereinheiten anderer [NiFe]-Hydrogenasen hat, von denen bereits Strukturen vorliegen. Die in der FrhA generierten Elektronen werden anschließend über drei [4Fe4S]-Cluster der kleinen Untereinheit FrhG (25 kDa), die von *frhG* kodiert wird, zu der Untereinheit FrhB (31 kDa) geleitet, die von *frhB* kodiert wird. Bei dieser Untereinheit handelt es sich um ein Eisen-Schwefel-Flavoprotein mit einem [4Fe4S]-Cluster, FAD und der vermuteten F_{420} -Bindestelle. *frhD* kodiert eine Endopeptidase, die Homolog zu HycI von *E. coli* ist und das C-terminale Ende von FrhA modifiziert (Böck et al. 2006).

Die kleine Untereinheit FrhG unterscheidet sich von denjenigen der meisten anderen [NiFe]-Hydrogenasen (Albracht 1994). Von den drei FeS-Clustern ist das medial zum aktiven Zentrum gelegene Cluster von FrhG höchstwahrscheinlich ein [4Fe4S]-Cluster (Fox et al. 1987), während es in anderen [NiFe]-Hydrogenasen fast immer ein [3Fe4S]-Cluster zu sein scheint. Mutationsstudien, in denen das mediale [4Fe4S]-Cluster von FrhG in ein [3Fe4S]-Cluster konvertiert wurde, führten zu einem signifikanten Aktivitätsverlust des FrhABG Komplexes, wenn F₄₂₀ als Elektronenakzeptor verwendet wird (Bingemann und Klein 2000b). Ein mediales [4Fe4S]-Cluster wird bisher nur noch in den [NiFeSe]-Hydrogenasen von *Desulfomicrobium baculatum* (Garcin et al. 1999) und *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (Valente et al. 2005; Matias et al. 2010) gefunden. Die beiden [NiFeSe]-Hydrogenasen sind im Periplasma der Sulfat-reduzierenden Bakterien lokalisiert, wo sie bei Wachstum der Organismen auf H₂ und Sulfat die Reduktion von Cytochrom *c*₃ mit H₂ katalysieren. Ob die beiden Enzyme auch an der H₂-Bildung der beiden Organismen bei Wachstum auf Laktat und Sulfat beteiligt sind, wurde auf transkriptionaler und translationaler Ebene untersucht. Es wurde eine erhöhte Expression der [NiFeSe]-Hydrogenasen und eine gleichzeitige verringerte Expression der [NiFe]-Hydrogenasen gezeigt (Caffrey et al. 2007).

Im C-terminalen Teil von FrhG sind acht Cysteine in einer charakteristischen Ferredoxin-ähnlichen Domäne angeordnet, die möglicherweise das mediale und distale [4Fe4S]-Cluster koordinieren (Alex et al. 1990a). In Abbildung 4 ist ein Schema wiedergegeben, wie man sich bisher den Komplex vorgestellt hat. Die Untereinheit FrhB zeigt Sequenzähnlichkeiten mit Untereinheiten von anderen F₄₂₀-abhängigen Enzymen, nämlich zu FdhB von F₄₂₀-abhängigen Formiat-Dehydrogenase (25%), zu FpoF des F₄₂₀H₂:Phenazin-Oxidoreduktase (35%), zu FqoF des F₄₂₀H₂Quinon-Oxidoreduktase Komplexes (36%), zum N-terminalen Bereich von F₄₂₀-abhängigen Sulfit-Reduktase (Fsr) (40%) und zu der Untereinheit 4 von F₄₂₀-abhängigen Glutamatsynthase (37%). Von keinem dieser Enzyme ist eine Struktur bekannt und damit auch nicht die F₄₂₀-Bindestelle. Aber man weiß von FrhABG, dass der reversible Hydridtransfer stereospezifisch in die pro-S-Position des C5 von F₄₂₀ erfolgt (Teshima et al. 1985; Yamazaki et al. 1985), was die Seite der Bindung von F₄₂₀ über dem FAD des Enzyms festlegt.

F₄₂₀-reduzierende [NiFe]-Hydrogenase (Frh)

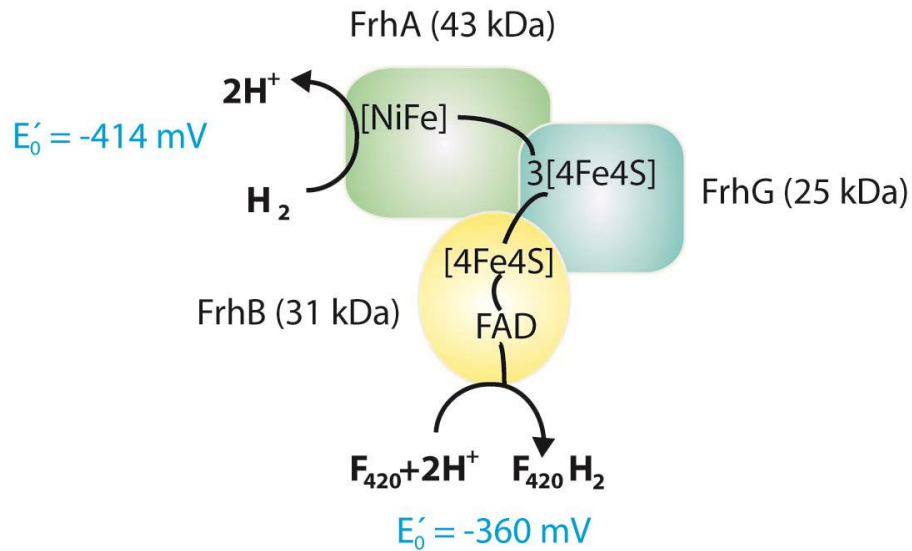


Abbildung 4: Schema der F₄₂₀-reduzierenden [NiFe]-Hydrogenase (FrhABG) basierend auf der Untereinheitenzusammensetzung und der vermuteten Funktion der Untereinheiten.

Methanococcus, *Methanocaldococcus* und *Methanopyrus* verfügen neben der F₄₂₀-reduzierenden [NiFe]-Hydrogenase FrcABG auch noch über eine F₄₂₀-reduzierende [NiFeSe]-Hydrogenase FruABG, in der das Nickelatom im aktiven Zentrum durch ein Selenocystein anstelle eines der Cysteine koordiniert wird. Eine Selenocystein-spezifische tRNA (tRNA^{sec}) vermittelt dabei die Insertion des Selenocysteins in das aktive Zentrum (Stock et al. 2011). Nur in Abwesenheit von Selen wird die selenfreie Hydrogenase FrcABG exprimiert (Sorgenfrei et al. 1997b). In *M. barkeri* hingegen wurden zwei F₄₂₀-reduzierende [NiFe]-Hydrogenase Isoenzyme gefunden. Beide werden in transkriptionellen Einheiten, nämlich *frhADGB* und *freAEGB*, kodiert (Vaupel und Thauer 1998). Unterschiedliche Wachstumssubstrate zeigten, dass beide Gencluster zur gleichen Zeit transkribiert werden. Möglich ist, dass die beiden Isoenzyme unterschiedliche apparente K_m-Werte für H₂ aufweisen, so dass der Organismus die H₂-Oxidation über einen breiteren H₂-Konzentrationsbereich katalysieren kann (Vaupel und Thauer 1998).

[NiFeSe]-Hydrogenasen werden nicht nur in methanogenen Archaeen gefunden, sondern auch in anaeroben Bakterien. So sind die bereits oben erwähnten periplasmischen Hydrogenasen von *Desulfomicrobium baculatum* (Garcin et al. 1999) und *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (Valente et al. 2005) beides [NiFeSe]-Hydrogenasen. Im Vergleich zu den [NiFe]-Hydrogenasen von *D. baculatum* und *D. vulgaris* Hildenborough weisen die [NiFeSe]-Hydrogenasen eine höhere Aktivität in der H₂-Produktion auf. Auch zeigen sie dabei eine höhere Resistenz gegenüber der Inaktivierung von Sauerstoff (Parkin et al. 2008; Marques et al. 2010). Ob das etwas mit dem Unterschied im medialen FeS-Cluster in der kleinen Untereinheit zu tun hat, oder mit dem Selen im aktiven Zentrum der großen Untereinheit, ist unbekannt. Aufgrund der O₂-Toleranz werden die beiden bakteriellen [NiFeSe]-Hydrogenasen als potentielle biologische H₂-Produzenten gesehen.

Einordnung der F_{420} -reduzierenden [NiFe]-Hydrogenase unter [NiFe]-Hydrogenasen

Wie bereits erwähnt weist die Untereinheit FrhA Sequenzähnlichkeiten mit der großen Untereinheit anderer [NiFe]-Hydrogenasen auf. Aufgrund von phylogenetischen Analysen der konservierten Sequenzelemente der Nickel-bindenden Regionen von 16 [NiFe]-Hydrogenasen teilte Voordouw erstmals diese [NiFe]-Hydrogenasen in vier unterschiedliche Gruppen (Voordouw 1992). Die Gruppeneinteilung aufgrund der konservierten Elemente ist auch heute noch aktuell, wurde jedoch um eine fünfte Gruppe erweitert (Vignais und Billoud 2007; Constant et al. 2011). Die [NiFe]-Hydrogenase Gruppen werden in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Einteilung der [NiFe]-Hydrogenase Gruppen nach Vignais (Vignais und Billoud 2007).

Die Aufteilung der [NiFe]-Hydrogenasen in fünf unterschiedliche Gruppen erfolgte nach phylogenetischen Analysen der konservierten Sequenzelemente der Nickel-bindenden Regionen. Gruppe 1 erfasst periplasmatische, Membran-gebundene H_2 -aufnehmende Hydrogenasen, welche die Oxidation von H_2 an eine aerobe oder anaerobe Atmungskette koppeln. Gruppe 2 beinhaltet zwei Subklassen: die cyanobakteriale H_2 -aufnehmende Hydrogenase recycelt H_2 , und eine H_2 -sensorische Hydrogenase, der eine transkriptionale Kontrolle in aerob H_2 -oxidierenden Bakterien zu Teil wird. Zur Gruppe 3 gehören u.a. physiologisch bidirektionale [NiFe]-Hydrogenasen, wie die FrhABG. Es gibt zusätzlichen Untereinheiten für die Bindung von F_{420} , NAD^+ und $NADP^+$. Gruppe 4 setzt sich aus Mitgliedern mit Membran-gebundenen Energie-konservierenden Hydrogenasen zusammen. Diese Hydrogenasen sind ebenfalls *in vivo* bidirektional. Die fünfte Gruppe beinhaltet Hydrogenasen, die eine sehr hohe Affinität zu H_2 aufweisen.

Gruppe	[NiFe]-Hydrogenasen		Funktion <i>in vivo</i>	Große Untereinheiten
1	Periplasmatische, Membran-assozierte H_2 -aufnehmende Hydrogenasen		aufnehmend	VhtA, VhoA, HubL, HydA, HubAB, HyaB, HoxG, MbhL, HybC, HynL, HysAB, CytC3 H ₂ ase, CytC3A
2	2a	Cyanobakteriale H_2 -aufnehmende Hydrogenasen	aufnehmend	HubL, MbhL
	2b	H_2 -sensorische Hydrogenasen	aufnehmend	HubV, HaxC
3	3a	F_{420} -reduzierende Hydrogenasen	bidirektional	FrhA, FruA, FrcA
	3b	NADP-reduzierende Hydrogenasen	bidirektional	ShyA, HyjL, Hyd α , HyhL, HydA
	3c	Methylviologen-reduzierende Hydrogenasen	aufnehmend	MvhA, VhcA, VhuA, MvhL
	3d	NADP/NAD-reduzierende Hydrogenasen	bidirektional	HoxH
4	Membran-gebundene Energie-konservierende Hydrogenase (Plasma-orientiert)		bidirektional	EchE, EhaO, EhbN, MbhN, HycE, HyfG, CooH
5	Hochaffine Hydrogenase		aufnehmend	HhyL

Gruppe 1 erfasst periplasmatische H₂-aufnehmenden Hydrogenasen, welche die Oxidation von H₂ an eine aerobe oder anaerobe Atmungskette koppeln. Zu dieser Gruppe gehören auch die periplasmatischen [NiFeSe]-Hydrogenasen von Sulfat-reduzierenden Bakterien. Alle bisher bekannten [NiFe]-Hydrogenase Strukturen wurden von Proteinen dieser Gruppe gelöst. Gruppe 2 beinhaltet zwei Subklassen cytoplasmatischer Hydrogenasen: die cyanobakteriale H₂-aufnehmenden Hydrogenasen rezyklisieren H₂, das durch Nitrogenaseaktivität entsteht, und eine H₂-sensorische Hydrogenase, der eine transkriptionale Kontrolle in aerob H₂-oxidierenden Bakterien zukommt. Hydrogenasen der dritten Gruppe, wie auch die für diese Arbeit relevante FrhABG, bestehen aus vier Subklassen mit zusätzlichen Untereinheiten, die die Coenzyme F₄₂₀, NAD⁺ und NADP⁺ binden können. Bis auf die Methylviologen-reduzierenden Hydrogenasen der Gruppe 3c sind die Hydrogenasen dieser dritten Gruppe *in vivo* bidirektional und katalysieren unter anaeroben Bedingungen die reversible Reoxidation der Coenzyme (Abbildung 3). [NiFe]-Hydrogenasen der Gruppe 4 bestehen aus einem Membran-gebundenen Energie-konservierenden Multienzymkomplex mit sechs oder mehr Untereinheiten. Die [NiFe]-Zentrum tragende Untereinheit zeigt dabei ins Zytoplasma. Auch diese Gruppe weist *in vivo* bidirektionale Eigenschaften auf, indem z.B. die Reduktion von Ferredoxin mit H₂ auch in umgekehrter Richtung katalysiert werden kann, wenn anaerobe Bakterien beispielsweise chemolithoautotroph auf CO wachsen (Oelgeschläger und Rother 2008). Die erst kürzlich von Constant *et al.* ausführlicher in *Streptomyces spp.* charakterisierte fünfte Gruppe beinhaltet Hydrogenasen, die eine sehr hohe Affinität zu H₂ aufweisen ($K_{m(app)} = 10\text{--}70\text{ nM}$) (Constant et al. 2010). Diese Hydrogenasen können H₂ aus der Atmosphäre verwerten, im Gegensatz zu allen anderen Hydrogenasen, die für H₂ nur eine sehr viel niedrigere apparente Affinität haben ($K_{m(app)} = >800\text{ nM}$) (Conrad et al. 1983).

Struktur von [NiFe]-Hydrogenasen der Gruppe 1

Wie schon erwähnt, wurden alle bisher bekannten Strukturen der [NiFe]-Hydrogenasen von Proteinen gelöst, die sich in Gruppe 1 einordnen lassen. Sie gehören damit alle zu den periplasmatischen, Membran-assoziierten, H₂-aufnehmenden Hydrogenasen, die *in vivo* nicht bidirektional agieren. Prinzipiell setzt sich jede dieser [NiFe]-Hydrogenasen aus mindestens zwei Untereinheiten zusammen: einer großen Untereinheit mit molekularen Massen von 40 bis 68 kDa und einer kleinen Untereinheit mit molekularen Massen von 16 bis 30 kDa. Dabei stellte sich heraus, dass sich die große Untereinheit in allen strukturell untersuchten Hydrogenasen gleichen bzw. die nicht strukturell charakterisierten Untereinheiten anderer [NiFe]-Hydrogenasen hohe Sequenzähnlichkeiten zu den bereits bekannten zeigen. Die große Untereinheit koordiniert das aktive Zentrum, das aus einem Nickel- und einem Eisenatom besteht, während die kleine Untereinheit drei FeS-Cluster beherbergt. Die meisten [NiFe]-Hydrogenasen enthalten neben den beiden Untereinheiten ein bis zwei weitere nicht konservierte Untereinheiten, die mit den entsprechenden physiologischen Elektronenakzeptoren interagieren (Schwarz und Friedrich 2003).

Die erste Kristallstruktur einer [NiFe]-Hydrogenase von *Desulfovibrio gigas* (Volbeda et al. 1995), die im Folgenden als Standardhydrogenase bezeichnet wird, lieferte erste detaillierte Informationen über den molekularen Aufbau des aktiven Zentrums (Abbildung 5). Das Nickel-Ion wird über vier Cystein-Thiolate koordiniert, wobei zwei dieser Thiolate eine zusätzliche Brücke zu dem Eisen bilden. Des Weiteren wird das Eisen durch drei diatomische Liganden, einem CO und zwei CN⁻, ligiert (Armstrong und Albracht 2005).

Die Strukturen der [NiFeSe]-Hydrogenasen, ebenfalls vom Gruppe 1, aus *D. baculatum* und *D. vulgaris* Hildenborough zeigen das gleiche Bild. Nur enthalten sie im aktiven Zentrum ein Selenocystein, welches anstelle eines der Cysteine das Nickelatom koordiniert (Abbildung 5). Der strukturelle Aufbau des aktiven Zentrums zeigt keine weiteren Veränderungen zur Standardhydrogenase. Die Elektronen, die von der Oxidation des H₂ stammen, werden vom [NiFe]-Zentrum der großen Untereinheit zum proximalen FeS-Cluster der kleinen Untereinheit transferiert, das nur in einem Abstand von 6 Å vom [NiFe]-Zentrum im Enzymkomplex zu liegen kommt (Abbildung 5). Das proximale Cluster ist für die Hydrogenaseaktivität essentiell, die große Untereinheit alleine hat keine Hydrogenaseaktivität (Massanz et al. 1998). Von dem proximalen Cluster werden die Elektronen über das mediale [3Fe4S]-Cluster zum terminalen [4Fe4S]-Cluster der kleinen Untereinheit weitergeleitet. Die drei FeS-Cluster in der kleinen Untereinheit der Standardhydrogenase sind linear und in einem für den Elektronentransport geeigneten Abstand angeordnet (Marcus 1956c).

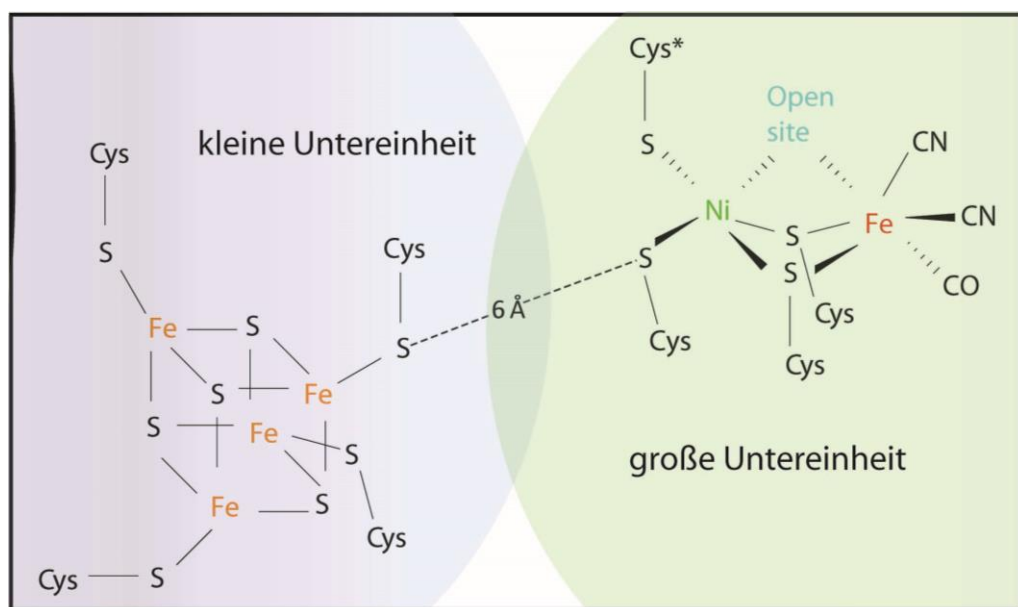


Abbildung 5: Schematischer Aufbau des aktiven Zentrums der Standardhydrogenase mit dem proximalen [4Fe4S]-Cluster aus *D. gigas* (Volbeda et al. 1995). Das Nickel des aktiven Zentrums wird über vier Cystein-Thiolate koordiniert, zwei dieser Thiolate bilden eine zusätzliche Brücke zu dem Eisen. Das Eisen wird zusätzlich durch drei diatomische Reste, einem CO und zwei CN⁻, ligiert. Das proximale Cluster der kleinen Untereinheit (blau) ist 6 Å vom [NiFe]-Zentrum der großen Untereinheit (grün) entfernt. Cys530, als Cys* markiert, ist in [NiFeSe]-Hydrogenasen durch ein Selenocystein ersetzt (SeCys487 in *D. baculatum*, PDB-Code: 1cc1; (Thauer et al. 2010)).

Das proximale Cluster der Standardhydrogenase ist ein $[4\text{Fe}4\text{S}]$ -Cluster und wird von vier Cysteinen koordiniert, wobei je ein Schwefel des jeweiligen Cystein mit einem Eisen des $[4\text{Fe}4\text{S}]$ -Clusters eine Bindung eingeht (Abbildung 6 A). Dies gilt für die $[\text{NiFe}]$ -Hydrogenasen von *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (Higuchi et al. 1997; Higuchi et al. 1999), *Desulfovibrio fructosovorans* (Montet et al. 1997; Volbeda et al. 2002; Volbeda et al. 2005), *Desulfovibrio desulfuricans* (ATCC 27774) (Matias et al. 2001), und *Allochromatium vinosum* (Ogata et al. 2010), von denen es Strukturen gibt.

Während das proximale FeS-Cluster der kleinen Untereinheit in den eben erwähnten $[\text{NiFe}]$ -Hydrogenasen aus anaeroben Bakterien ein $[4\text{Fe}4\text{S}]$ -Cluster ist (Abbildung 6 A), gilt dies nicht für das proximale Cluster der kleinen Untereinheit von $[\text{NiFe}]$ -Hydrogenasen aus aeroben Bakterien. Die erst kürzlich gelösten Kristallstrukturen von sauerstofftoleranten $[\text{NiFe}]$ -Hydrogenasen aus den aeroben H_2 -Oxidierern *Ralstonia eutropha* H16 (Fritsch et al. 2011), *Hydrogenovibrio marinus* MBH (Shomura et al. 2011) und *E. coli* (Volbeda et al. 2012) weisen ein proximales $[4\text{Fe}3\text{S}]$ -Cluster auf (Abbildung 6 B). Das neuartige $[4\text{Fe}3\text{S}]$ -Cluster ist von sechs Cysteinen koordiniert. Vier der Cysteine liegen hochkonserviert vor und koordinieren wie in dem $[4\text{Fe}4\text{S}]$ -Cluster der Standardhydrogenase die vier Eisen des Clusters. Eines der beiden zusätzlichen Cysteine, Cys120, bindet zusätzlich das Fe_3 , wohingegen Cys19 jeweils das Fe_1 und Fe_4 koordiniert. ESR (Elektronenspinresonanz)-spektroskopische Untersuchungen zeigen für das $[4\text{Fe}3\text{S}]$ -Cluster ein ungewöhnliches Redoxverhalten, das mit der Sauerstofftoleranz dieser Hydrogenasen in Verbindung gebracht wird (Pandelia et al. 2011).

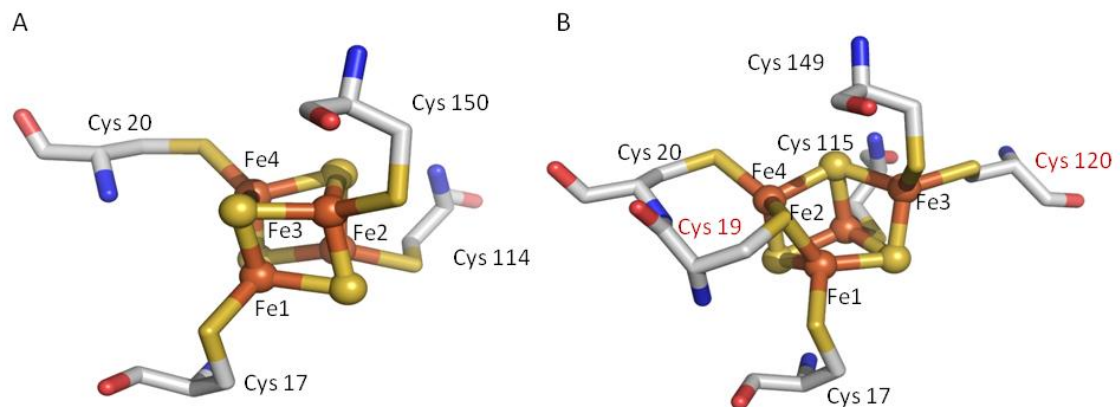


Abbildung 6: Architektur der proximalen FeS-Cluster von $[\text{NiFe}]$ -Hydrogenasen. A: schematische Darstellung des proximalen $[4\text{Fe}4\text{S}]$ -Clusters von *D. gigas* (Volbeda et al. 1995), PDB-Code: 1frv. Das $[4\text{Fe}4\text{S}]$ -Cluster wird von den vier Cysteinen 17, 20, 114 und 150 koordiniert, wobei je ein Schwefel des jeweiligen Cysteins mit einem Eisen des $[4\text{Fe}4\text{S}]$ -Clusters eine Bindung eingeht. B: schematische Darstellung des proximalen $[4\text{Fe}3\text{S}]$ -Clusters von *R. eutropha* (Fritsch et al. 2011), PDB-Code: 3rgw. Das $[4\text{Fe}3\text{S}]$ -Cluster wird von den sechs Cysteinen Cys17, Cys19, Cys20, Cys115, Cys120, Cys149 koordiniert. Vier der Cysteine liegen hochkonserviert vor und koordinieren wie in dem $[4\text{Fe}4\text{S}]$ -Cluster der Standardhydrogenase die vier Eisen des Clusters. Eines der beiden zusätzlichen Cysteine, Cys120 (rot), bindet zusätzlich das Fe_3 , wohingegen Cys19 (in rot) jeweils das Fe_1 und Fe_4 mitkoordiniert.

Ziel der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Struktur des F_{420} -reduzierenden FrhABG Komplexes aufzuklären. Das Interesse der Strukturaufklärung ist darin begründet, dass zum einen die [NiFe]-Hydrogenase FrhABG funktional reversibel ist und phylogenetisch zur Gruppe 3 von [NiFe]-Hydrogenasen gehört. Dies unterscheidet das Enzym zu allen strukturell untersuchten [NiFe]-Hydrogenasen, die nicht physiologisch reversibel sind und zur Gruppe 1 gezählt werden. Und ein weiterer sehr interessanter Punkt ist, dass - wie bereits erwähnt - der FrhABG Komplex die Untereinheit B enthält, die phylogenetisch verwandt ist zu anderen F_{420} -abhängigen Enzymen, von denen es ebenfalls noch keine Strukturen gibt.

Die makromolekulare Struktur von FrhABG legte es nahe, den multimeren Komplex zunächst Cryo-elektronenmikroskopisch zu charakterisieren. Dies gelang mit einer einmaligen Auflösung von $\sim 4\text{\AA}$. Durch diese hohe Auflösung war es möglich, die Sekundärstruktur des FrhABG Komplexes zu lösen und einige Seitenketten in die Elektronendichte anzupassen. Parallel zu den Cryo-elektronenmikroskopischen Untersuchungen erfolgte die Strukturlösung mittels Röntgenstrukturanalyse. Ein Problem war, dass die Proteinkristalle eine Zwillingsseigenschaft aufwiesen. Die Kristallstruktur wurde aber mit einem Kristall gelöst, bei dem der Anteil der Zwillingspartner etwa 75:25 betrug, also näherungsweise als ein Einkristall betrachtet werden konnte. Es wurden relativ schlechte Phasen erhalten, die mit denjenigen aus dem Cryo-EM Modell berechneten Phasen kombiniert und dadurch entscheidend verbessert wurden. Die Kristallstruktur erlaubte eine Verfeinerung bis zu einer Auflösung von $1,8\text{ \AA}$, was eine exakte Analyse insbesondere der Metallzentren erlaubte.

Da keine Elektronendichte mit gebundenem F_{420} erhalten werden konnte, jedoch gezeigt werden sollte, dass FrhB tatsächlich die Untereinheit ist, an der F_{420} reduziert wird, wurde FrhB heterolog produziert und charakterisiert. Dazu wurde das Gen *frhB* aus *M. jannaschii* gewählt, um es in *E. coli* zu produzieren. Die Entscheidung *frhB* aus *M. jannaschii* anstelle aus *M. marburgensis* zu verwenden, liegt zum einen darin begründet, dass der verwendete Organismus ein hyperthermophiler Organismus mit Wachstumsoptima von über 85°C ist. *M. jannaschii* gehört in die Ordnung der *Methanococcales* und kann auf H_2 und CO_2 und auf Formiat als Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen. Dabei werden bei optimalen Bedingungen Verdopplungszeiten von 55 Minuten, allerdings nur bis zu sehr geringen Zelldichten, erreicht. Die heterolog produzierten Proteine weisen üblicherweise eine höhere Thermostabilität auf. Zum anderen zeigten langjährige Erfahrungen, dass viele Proteine ausgehend von Genen aus *M. marburgensis* in *E. coli* kaum produziert werden, was bisher jedoch nicht verstanden wird.

2 Material und Methoden

Alle Feinchemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Carl Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt) bezogen. Alle Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad „zur Analyse“ oder „für biochemische Zwecke“. Lösungsmittel hatten den HPLC-Reinheitsgrad. Für molekularbiologische Arbeiten verwendete Enzyme wurden, wenn nicht anders angegeben, von Fermentas (Thermo Fisher Scientific Waltham, USA) und NEB (New England Biolabs, Frankfurt a.M.) bezogen. Säulenmaterialien für chromatographische Schritte in der Proteinreinigung wurden, wenn nicht anders angegeben, von GE-Healthcare (General Electrics, USA) und von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Die Gase N₂ (99,996%), H₂ (99,995%), H₂S (~99%), H₂/CO₂ (80%/20%), Formiergas (5% H₂/95% N₂) (Reinheit N₂ und H₂: 99,996%, Reinheit CO₂ 99,995%) wurden von Messer Industriegase (Düsseldorf) bezogen. Arbeiten unter Sauerstoffausschluss wurden in Anaerobenzelten (Coy, Ann Arbor, Michigan, USA; Töpfer Lab Systems, Göppingen) durchgeführt. Diese enthielten eine Atmosphäre aus Formiergas. Sauerstoff wurde aus der Zeltatmosphäre kontinuierlich durch Reduktion mit H₂ an einem Palladium-Katalysator (R-020/13, BASF, Ludwigshafen) entfernt. Dadurch entstehendes Wasser wurde mittels Silica Gel Orange (Roth, Karlsruhe) entzogen.

2.1 Kultivierung von Mikroorganismen

2.1.1 *Methanothermobacter marburgensis*

Methanothermobacter marburgensis (DSM 2133) wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen DSMZ (Braunschweig) bezogen. *M. marburgensis* ist ein strikt anaerober, methanogener Organismus, der bei einem Temperaturoptimum von 65°C mit H₂ und CO₂ als Substrat wächst. *M. marburgensis* Medium wurde nach Schönheit (Schönheit et al. 1980) hergestellt. Auf eine Stammhaltung des Organismus kann verzichtet werden, da auch nach einer 2-monatigen Lagerung (bei 4°C) die Zellen gut anwachsen. Unter den angegebenen Bedingungen wurde *M. marburgensis* in 10-L Fermentern mit einer Verdopplungszeit von ca. 2 Stunden bis zu einer optische Dichte (ΔOD) bei 578 nm von ca. 5,0 kultiviert. Die ΔOD wurde an einem Ultrospec® 3100 pro Photometer der Firma Amersham Biosciences (Piscataway, New Jersey, USA) gemessen. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Zentrifuge (Sorvall RC 5B Plus, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) bei 13.500 x g anaerob abgeerntet.

2.1.2 *Escherichia coli*

Für molekularbiologische Arbeiten wurde die verwendeten *E. coli*-Stämme Top10 und BL21(DE3) (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) bei 37°C auf Luria-Bertani (LB) Flüssigmedium (1% (w/v) NaCl, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1,0% (w/v) Trypton) kultiviert. Festmedien enthielten zusätzlich 1,5% (w/v) Agar. Zur Konservierung der Stämme wurden Zellkulturen mit 10% (v/v) Glycerin in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2 Klonierung des *frhB*-Gens aus *Methanocaldococcus jannaschii*

2.2.1 Extraktion und Reinigung genomischer DNS

Genomische DNS aus *Methanocaldococcus jannaschii* wurde für molekularbiologische Arbeiten mittels Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert (Sambrook und Russell, 2000) und stand zur Verfügung. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten DNS wurde mithilfe eines Nanodrop ND 1000 Spectrometer (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) durchgeführt.

2.2.2 Klonierung des *frhB*-Gens aus *M. jannaschii*

Das *frhB*-Gen wurde unter Verwendung einer high-fidelity Phusion DNS Polymerase mittels PCR amplifiziert (Mullis et al., 1986). Dabei wurde genomische DNS von *M. jannaschii* als Template verwendet. Zusätzlich wurde das Gen mit einer 3'-His₆ Kasette versehen. Folgende Oligonukleotide wurden nach Standard-Methoden abgeleitet und nach Angaben des Herstellers in H₂O_{dest} gelöst (100 pmol/μl): 5'-AGCCATATGATGAGGTGGAATAGGATGAATCCTTTTG-GTAGC-3' (forward Primer; die *Nde*I Restriktionsschnittstelle wurde unterstrichen) und 5'-CAGTCTCGAGGTATGGAATAGGTAGTCCGAGCTCTTTTCAATG-3' (reverse Primer; die *Xho*I Restriktionsschnittstelle wurde unterstrichen). DNS-Fragmente wurden aus genomischer DNS mittels PCR amplifiziert.

Komponenten	Menge	Konzentration
Puffer (5 x HF)	10 μl	5 x
dNTPs	1 μl	2 mM
Oligonukleotid	2,5 μl	10 pmol/ml
Oligonukleotid	2,5 μl	10 pmol/ml
DNS	-	200 ng
Polymerase (Phusion HF)	0,5 μl	2 U/ml
H ₂ O	ad 50 μl	-

Das PCR-Programm wurde den Elongationszeiten und den Anlagerungs-Temperaturen der Oligonukleotide und amplifizierenden Fragmente angepasst.

Schritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	98°C	2 min
Denaturierung	95°C	1 min
Anlagerung	variabel	1 min
Elongation	72°C	Variabel, 2.–4.: 30 Zyklen
Halteposition	4°C	

Die Ligation des sogenannten Blunt PCR Produkts in den pCR Blunt Vektor (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) erfolgte nach Herstellerangaben mittels T4-DNS-Ligase. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C, wobei DNS-Fragment und Vektor im Verhältnis 10:1 molar eingesetzt wurden. Der Vektor hatte eine Konzentration von 25 ng. Anschließend wurde das Ligationsprodukt nach Herstellerangaben elektrokompente *E. coli* TOP10 Zellen transformiert. Nach erfolgreicher Sequenzierung wurde das Konstrukt in den Expressionsvektor pET24b(+), der mit *NdeI* und *XhoI* gesechnitten wurde, ligiert. Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben mit HC (High concentrated)-T4-Ligase. Die Ligation erfolgte für 50 min bei Raumtemperatur, wobei DNS-Fragment und Vektor im Verhältnis 20:1 molar eingesetzt wurden. Der Vektor hatte eine Konzentration von 25 ng. Das neue Konstrukt wurde wieder in TOP10 Zellen transformiert und mittels DNS-Sequenzierung (LGC Genomics, Berlin) verifiziert. Wobei Plasmidpräparationen aus 5 ml LB-Kulturen mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Qiagen GmbH, Hilden) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt wurden. Es wurde mit 30 µl sterilem H₂O eluiert. Anschließend erfolgte eine Transformation des positiven Konstrukts in *E. coli* BL21(DE3) für eine Expression von FrhB.

2.3 Überexpression des *fthB*-Gens in *E. coli*

Für die Reinigung von FrhB wurden die *E. coli* BL21(DE3) Zellen in 2 Liter LB-Medium mit Antibiotika (100 µg/l Kanamycin) bei 37°C kultiviert. Nach dem Animpfen des 2 l-Kolbens auf eine optischen Dichte von OD₆₀₀ = 0,1 mit einer Übernachtskultur, wurden die Zellen unter starken Rühren mit 550 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8–1,0 kultiviert. Anschließend wurde die Genexpression von *fthB* mit 0,5 mM IPTG induziert. Es erfolgte zudem eine *in vivo* Rekonstitution des FeS-Zentrums (Wang et al. 2010). Dazu wurde dem 2 l-Kolben nach Induktion folgende Komponenten hinzugegeben: 0,12 g/l Cystein, 0,1 g/l Eisen-Sulfat, 0,1 g/l Eisen-Citrat und 0,1 g/l Eisen-Ammonium-Citrat. Nach weiterem leichtem Rühren mit 250 rpm bei Raumtemperatur für 20 h wurde die Kultur stehend für weitere 20 h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei 10.000 x g, 20 min und 4°C (Sorvall RC 5B Plus, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) geerntet und bei -80°C unter N₂ Atmosphäre gelagert.

2.4 Aufreinigung von nativer FrhABG und heterolog produzierter FrhB

Alle folgenden chromatographischen Reinigungsschritte wurden mit Hilfe eines FPLC Systems (Pumpe P-500, Gradient Controller GP-250) unter strikt anaeroben Bedingungen bei 18°C in einem anaeroben Zelt (Coy Laboratory Products) mit einer N₂/H₂ (95%/5%) Atmosphäre durchgeführt. Die Detektion der Proteine erfolgte bei einer Absorption von 280 nm und der Reinheitsgrad wurde mittels SDS-PAGE (2.6.1) überprüft. Zusätzlich wurden die drei Untereinheiten des FrhABG Komplexes und die heterolog produzierte FrhB Untereinheit zusätzlich mit MALDI-TOF Analyse identifiziert.

2.4.1 FrhABG-Komplex aus *M. marburgensis*

Alle verwendeten Puffer enthielten 2 mM DTT, 4 mM Na-Dithionit und 25 μ M FAD. Der Zellextrakt wurde routinemäßig aus 20 g (Feuchtmasse) Zellen von *M. marburgensis* hergestellt. Dazu wurden die Zellen in 40 ml 50 mM Tris/HCl pH 7,6 (Puffer A) resuspendiert und 4 Mal mittels French Press Hochdruck-Homogenisator in einer Standard-Zelle (Heinemann) bei 125 MPa aufgeschlossen, die zuvor mit einem N₂-Strom für 20 min anaerobisiert wurde. Zelltrümer wurden durch einen Zentrifugationsschritt bei 15.000 x g für 30 min bei 4°C entfernt. Das Reinigungsprotokoll enthält zwei Größenausschlusschromatographieschritte, um kleine Proteinpartikel und große Aggregate von der Proteinlösung mit FrhABG Aktivität zu entfernen, welche die Kristallisierung bzw. die Einzelpartikel Cryo-Elektronenmikroskopie Analysen stören.

Hydrophobe Chromatographie an Phenyl Sepharose 6 Fast Flow:

Der Überstand enthielt üblicherweise ca. 1000 mg Protein und wurde auf 800 mM (NH₄)₂SO₄ in Puffer A eingestellt und anschließend für 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Der Zellextrakt wurde auf eine Phenyl Sepharose 6 Fast Flow Säule (6 cm x 10 cm), welche mit 800 mM NH₄SO₄ in Puffer A equilibriert wurde, aufgetragen. Die Elution der Proteine von dem Material erfolgte in einem NH₄SO₄ Stufengradienten in Puffer A: 800 mM NH₄SO₄ für 250 ml, 200 mM NH₄SO₄ für 250 ml und 0 mM NH₄SO₄ für 50 ml (Flussrate: 8 ml/min). Die FrhABG Aktivität eluierte bei 0 mM NH₄SO₄.

Größenausschlusschromatographie an einer Sephacryl S-400 HR Säule:

Die Proteinlösung wurde mit einer Ultrafiltration mittels Amicon Filtern (100 kDa Ausschlussgröße aus Nitrozellulose, Millipore, Eschborn) auf 4–5 ml ankonzentriert und anschließend durch eine Größenausschlusschromatographie an einer Sephacryl S-400 HR Säule (2,6 cm x 60 cm) weiter gereinigt. Die Säule wurde mit Puffer B (Puffer A + 150 mM NaCl) äquilibriert. Die FrhABG Aktivität wurde durch Waschen der Säule mit Puffer B (Flussrate: 1 ml/min) nach ca. 180 ml eluiert.

CHAPS-Inkubation:

Die vereinigten Fraktionen wurden anschließend mit einer Ultrafiltration mittels Amicon Filtern (100 kDa Ausschlussgröße) auf 20 mg/ml konzentriert und mit 48 mM CHAPS, als dissoziierendes Reagens, versetzt und anschließend für 12 h bei Raumtemperatur langsam gerührt. Damit wurden Proteine die an FrhABG binden von dem Komplex gelöst.

Anionenaustausch-Chromatographie an MonoQ:

Die Proteinlösung der Sephacryl S-400 HR Fraktionen wurde 5 Mal mit Puffer A2 (Puffer A, 4 mM CHAPS) gewaschen und anschließend auf 1 ml ankonzentriert. Anschließend wurde die Proteinlösung auf eine MonoQ Säule (1 x 8 cm) aufgetragen, welche mit Puffer A2 äquilibriert war. Die Elution der Proteine von dem Material erfolgte in einem linearen NaCl-Gradienten in Puffer

A2: 0–400 mM NaCl in 25 ml und 400–600 mM NaCl in 20 ml (Flussrate: 0,8 ml/min). Die FrhABG Aktivität wurde mit 540 mM NaCl von dem Säulenmaterial eluiert.

2.4.2 FrhB aus *E. coli*

Alle verwendeten Puffer enthielten 2 mM DTT und 10 μ M FAD. Der Zellextrakt wurde routinemäßig aus 5 g (Feuchtmasse) Zellen von *E. coli* hergestellt. Dazu wurden die Zellen in 15 ml Puffer A1 (20 mM Imidazol, 150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,5) resuspendiert und 3 Mal mittels French Press Hochdruck-Homogenisator (SLM) in einer Standard-Zelle (Heinemann) bei 110 MPa aufgeschlossen, die zuvor mit einem N₂-Strom für 20 min anaerobisiert wurde. Zelltrümmern und Membranen wurden durch einen Zentrifugationsschritt bei 150.000 x g für 30 min bei 4°C entfernt. Der Überstand enthielt üblicherweise ca. 120 mg Protein.

Affinitätschromatographie an Nickel-Nitrilotriacetat (Ni-NTA) Superflow

Der Zellextrakt wurde auf eine Nickel-Nitrilotriacetat (Ni-NTA) Superflow Säule (Säulenvolumen: 5 ml), welche mit Puffer A äquilibriert war, aufgetragen. Die Elution der Proteine von dem Material erfolgte in einem Imidazol-Stufengradienten in Puffer A: 125 mM Imidazol für 100 ml und 250 mM Imidazol für 50 ml (Flussrate: 3 ml/min). Die FrhB-Aktivität eluierte im letzten Peak. Die Proteinlösung wurde mittels einer Ultrafiltration mit Amicon Filtern (10 kDa Ausschlussgröße) auf 4–5 ml ankonzentriert. Für Redox-titrations mittels ESR-Spektroskopie wurde aus der Proteinlösung mittels einer HiPrep 26/10 Desalting Sephadex™ G-25 Imidazol und ungebundenes FAD entfernt (Puffer B: 10% (v/v) Glycerin, 150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,5).

2.5 Isolierung von Coenzym F₄₂₀

Das für enzymatische Aktivitätstests und Röntgenstrukturanalysen benötigte Coenzym F₄₂₀ wurde aus *M. marburgensis* Zellen aerob isoliert, wie in Shima und Thauer beschrieben (Shima et al; Thauer 2001). Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der anderen aus dem Zellextrakt zu isolierenden Cofaktoren erfolgten die meisten Isolierungsschritte, soweit wie möglich, im Dunkeln. Für die Isolierung wurden 400 g Zellen in 500 ml H₂O resuspendiert und nach Zugabe von 2 g Na-Desoxycholat 30 min bei 4°C gerührt. Anschließend wurde der pH der Suspension mit 2 M Perchlorsäure auf pH 2 eingestellt und weitere 2 h im Dunkeln gerührt. Nach einer Zentrifugation bei 8.000 x g für 30 min wurde der Überstand bei -20°C eingefroren, das Pellet in 500 ml H₂O aufgenommen und der pH erneut auf pH 2 eingestellt. Nach weiterem Rühren bei 4°C im Dunkeln für zwei Stunden erfolgte eine erneute Zentrifugation. Der Überstand wurde bei -20°C gelagert. Diese Prozedur wurde zwei Mal wiederholt. Anschließend wurde der Gesamtüberstand erneut zentrifugiert und der pH-Wert der Lösung mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt, um ihn auf einen starken Ionenaustauscher (QAE Sephadex A25, 3 cm/20 cm) aufzutragen. Als Equilibrierungs- und Waschpuffer diente 50 mM Tris/HCl pH 7,5. Die Säule wurde anschließend mit einem Stufengradient aus Ameisensäure wie folgt gewaschen: 20 mM HCOOH für 500 ml, 50 mM

HCOOH für 500 ml, 100 mM HCOOH für 500 ml und 200 mM HCOOH für 500 ml. F₄₂₀ wird anschließend mit 50 mM HCl eluiert. Das Eluat wurde danach auf eine XAD-Säule (Serdolit PAD I), welche mit 50 mM Natrium-Formiat pH 3,0 equilibriert wurde, aufgetragen. Die Säule wurde mit 0,1% HCOOH gewaschen. F₄₂₀ eluiert mit 100% Methanol, welches anschließend am Rotavapor entfernt wurde. F₄₂₀ wird in H₂O aufgenommen, die Reinheit anhand des charakteristischen UV/Vis Spektrums überprüft und in 6 µMol Fraktionen portioniert und bei -20°C in lichtundurchlässigen Serumflaschen gelagert.

2.6 Bestimmung der FrhABG und FrhB Eigenschaften

2.6.1 Apparente molekulare Masse

Proteine wurden zur Reinheitskontrolle mittels SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli 1970) analysiert. Die Elektrophorese wurde in einer Elektrophoreseapparatur (Biorad, München) mit 4%-igen Sammelgelen und 12%-igen Trenngelen in Elektrophoresepuffer (25 mM Tris pH 8,3, 250 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS) durchgeführt. Die Volumina sind für zwei Mini-Gele (10 x 8 cm) angegeben.

Komponenten	Trenngel	Sammelgel
0,5 M Tris/HCl, 0,4% (w/v) SDS, pH 8,8	3,7 ml	-
1,5 M Tris/HCl, 0,4% (w/v) SDS, pH 6,8	-	387 µl
40%-ige Acrylamid-Lösung	2 ml	2,4 ml
H ₂ O	2,7 ml	510 µl
10% (w/v) APS	42 µl	12 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Vor dem Auftragen wurden je 30 µl Probe, mit bis zu 50 µg Protein, mit 3 x Probenpuffer (150 mM Tris/HCl pH 6,8, 36% (v/v) Glycerin, 12% (w/v) SDS, 12% (w/v) Mercaptoethanol, 0,5% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und für 10 min bei 95°C denaturiert, kurz auf Eis gestellt und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Als Massenstandard wurden 4 µl Prestained Protein Marker (Fermentas) aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstanter Spannung von 180 V. Zum Sichtbarmachen der Proteine diente Coomassie-Färber (0,05% (w/v) Serva Blue R (Coomassie R-250), 25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Eisessig). Das Gel wurde dann mit Coomassie-Entfärber (33% (v/v) Isopropanol und 10% (v/v) Eisessig) behandelt, bis der Farbstoff der nicht von Proteinen gebunden wurde, entfernt war. Die Auftrennung von Proteinkomplexen durch native Polyacrylamid Gelelektrophorese erfolgte mit 4–15% Polyacrylamid Native PAGE (Quiagen, München). Vor dem Auftragen wurden je 50 µl Probe, mit bis zu 50 µg Protein, mit 3 x Probenpuffer (50 % Glycerin, 0,1 % Ponceos 9) versetzt und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Der Elektrophoresepuffer (50 mM Tris HCL, 7,5 m Imidazol, pH 8,3) wurde ohne SDS

hergestellt. Als Massenstandard wurden 4 µl native Marker aufgetragen (Invitrogen). Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstanter Spannung von 60 V. Zum Sichtbarmachen der Proteine diente Coomassie-Färber. Das Gel wurde dann mit Coomassie-Entfärber behandelt, bis der Farbstoff, der nicht von Proteinen gebunden wurde, entfernt war.

2.6.2 Bestimmung von Nicht-Häm-Eisen

Da proteingebundenes Eisen durch eine Säure-Behandlung aus der Proteinumgebung herausgelöst werden kann, wird eine Komplexierung mit Ferene durch die Reduktion des Fe^{3+} zu Fe^{2+} mit Ascorbinsäure ermöglicht. Die Bildung eines blauen Farbstoffs kann zur Bestimmung des Eisengehaltes herangezogen werden (Janda und Hemmerich 1976).

Die Bestimmung des Eisengehaltes erfolgte in vier Schritten:

Der erste ist eine Säure-Behandlung. Dazu wurden die Proteinproben und der frisch angesetzte Eisen-Standard (0,2 mM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Mohrs Salz, 0,008%)) in einem Volumen von 100 µl vorgelegt, wobei der Eisen-Standard einen Konzentrationsbereich von ca. 2-20 nMol Fe abdecken sollte. Anschließend wurden 100 µl 1% HCl zugeben und gut geschüttelt. Daraufhin wurden die Eppendorf Cups verschlossen und bei 80 °C für 10 min inkubiert. Für die anschließende Chelatisierung wurden 7,5%-iges 500 µl Ammoniumacetat, frisch angesetzte 4%-ige 100 µl Ascorbinsäure, 2,5%-iges 100 µl Natriumdodecylsulfat (SDS) und 1,5%-ige 100 µl Ferene zur Lösung zugeben, und jedes Mal gut gemischt. Nachdem die Eppendorf Cups für 5 min bei 9.000 x g zentrifugiert worden sind, wurde die Absorption der Probe bei 593 nm ermittelt, als Blindwert dient H_2O .

2.6.3 Katalytische Eigenschaften

Alle Enzymtests wurden in mit Butylgummistopfen verschlossenen anaeroben Quarzküvetten durchgeführt. Die Küvetten hatten eine Schichtdicke von 1,0 cm, ein Volumen von 1,5 ml und wurden durch mehrmaliges Evakuieren und Begasen mit N_2 oder H_2 anaerobisiert. Die Komponenten der Tests wurden in Form von anaeroben Lösungen mit Hilfe von Mikroliter-Spritzen (Hamilton, Bonaduz/Schweiz) zugegeben. Für Messungen von Extinktionsänderungen bei 401 nm und 600 nm wurde ein Spektralphotometer (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet. Alle Enzymtests wurden bei 30°C (*E. coli*, FrhB) bzw. 65°C (*M. marburgensis*, FrhABG Komplex) durchgeführt.

Die Reduktion von F_{420} zu F_{420}H_2 durch den FrhABG Komplex wurde bei einer Wellenlänge von 401 nm verfolgt. Der anaerobe 0,7 ml Testansatz enthielt 100 mM HEPES/HCl pH 7,5 und wenn nicht anders angegeben, wurde 40 µM F_{420} ($\epsilon_{401} = 25,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei pH 7,5 (Keweloh 1980) und 10 µM Na-Dithionit zugegeben. Als Gasphase diente 0,2 ml H_2 . Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms (1–10 µg) gestartet.

Die Oxidation von $F_{420}H_2$ zu F_{420} durch die heterolog produzierte FrhB Untereinheit erfolgte in einem gekoppelten Enzymtest und wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt. Die Reduktion des F_{420} erfolgte in einem anaeroben 0,7 ml Testansatz, der, wenn nicht anders angegeben, folgende Komponenten enthielt: 0,68 ml KPi-Puffer (7 g KH_2PO_4 und 1,94 g K_2HPO_4 x 3 H_2O auf 500 ml) pH 7,0, 30 μM F_{420} , 35 μM Methenyl- H_4MPT^+ . Als Gasphase diente 0,2 ml N_2 , jedoch wurden die Küvetten mit H_2 anaerobisiert. Die Reduktion des F_{420} erfolgte durch heterolog produzierte Methylen- H_4MPT Dehydrogenase (Mtd) (30 U/mg). Nach erfolgreicher Reduktion des F_{420} , welche mit verblassen der gelblichen Farbe abgeschlossen war, wurde dem Testansatz 100 μM Benzylviologen zugefügt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von (1–20 μg) FrhB gestartet.

2.6.4 Redoxtitration von FrhABG und FrhB

Das Redoxpotential ist der wichtigste Parameter zur Charakterisierung von redoxaktiven Spezies. Das ermittelte Redoxpotential entspricht einer Gleichgewichtskonzentration von oxidiert und reduzierter Spezies und wird durch die Nernst-Gleichung beschrieben. Diese Gleichung beschreibt die reversible Reduktion einer oxidiert vorliegenden Spezies durch n Elektronen. Auch spielt die Konzentration der oxidierten (Ox) und reduzierten (Red) Spezies im Zusammenhang mit dem Potential der Lösung E eine Rolle:

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \cdot \ln\left(\frac{[Ox]}{[Red]}\right)$$

$$F = \text{Faradaykonstante } 96485,34 \text{ J/mol} \cdot \text{Volt (Ladung pro Mol Elektronen)}$$

$$R = \text{ideale Gaskonstante } 8,3144 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$$

$$T = \text{absolute Temperatur in K}$$

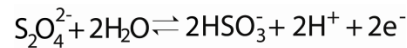
Wenn Standardbedingungen herrschen, entspricht das Potential E^0 (es gilt $[Red] = [Ox]$) dem Standard-Redoxpotential und ist gleichzeitig ein direktes Maß für die freie Standard-Enthalpie der Redoxreaktion:

$$\Delta G_0' = -n F E_0'$$

Die Reduktion einer Substanz durch eine andere ist dann begünstigt, wenn das Reduktionspotential niedrig (ins Negative) und die Konzentration an reduzierter Spezies hoch ist.

Eichung einer Natriumdithionit-Lösung

Natriumdithionit ist mit einem Redoxpotential von bis zu –660 mV bei pH 7,0 und 25°C ein starkes Reduktionsmittel. Pro oxidiertes Mol Natriumdithionit werden 2 Mol Elektronen in die Lösung freigesetzt. Das Redoxpotential des Natriumdithionit/(Bi)Sulfit Systems ist konzentrationsabhängig. Die anaerobe Oxidation von Natriumdithionit zu (Bi)Sulfit ist in folgender Gleichung gezeigt:



Das Reduktionspotential erhöht sich um 60 mV bei Alkalisierung um eine pH-Einheit. Da käufliches Natriumdithionit nur bis zu einer Reinheit von ca. 80% erhalten werden kann und eine sehr hohe Reaktivität zu Sauerstoff zeigt, muss eine genaue Bestimmung der vorhandenen Reduktionsequivalente erfolgen. Dazu werden 3 ml einer 1 mM Kaliumhexacyanoferrat-Lösung in einer Plastikkuvette vorgelegt. Durch sukzessive Zugabe (10–100 µl) der frisch in anaerobem H₂O angesetzten ca. 20 mM Natriumdithionit-Lösung wird die Kaliumhexacyanoferrat-Lösung titriert und die restliche Absorption bei 420 nm ermittelt. Die genaue Konzentration der Natriumdithionit-Lösung kann aus der Steigung der Ausgleichsgeraden ermittelt werden (Çinkaya 2002).

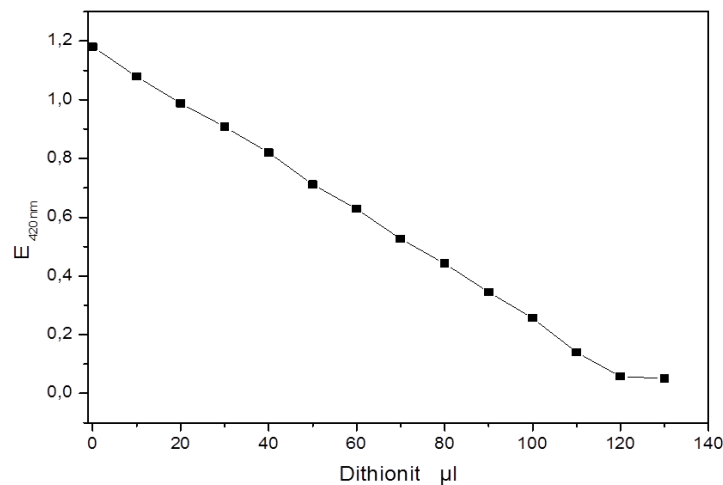


Abbildung 7: Eichung einer Natriumdithionit-Lösung mit Kaliumhexacyanoferrat. Eine 1 mM Kaliumhexacyanoferrat-Lösung wurde in einer 1 ml Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm vorgelegt und mit einer ungefähr 20 mM Natriumdithionit-Lösung titriert. Die Absorption bei 420 nm wurde gegen die Menge an zugegebenem Natriumdithionit aufgetragen. Aus der Steigung der Ausgleichsgeraden und dem Extinktionskoeffizienten von Kaliumhexacyanoferrat ($\epsilon_{420\text{nm}} = 1,02 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kann die genaue Konzentration der Natriumdithionit-Lösung errechnet werden.

Redox titration verfolgt mittels ESR-Spektroskopie

Die klassische Redox titration ist ein stationäres Verfahren zur Bestimmung des Redoxpotentials einer redoxaktiven Spezies. Durch die Zugabe von Oxidations- bzw. Reduktionsmitteln oder durch direkte Oxidation bzw. Reduktion mittels einer geeigneten Elektrode kann ein definiertes Potential der Lösung und damit auch der Probe eingestellt werden. Die Bestimmung des Potentials erfolgt mit zwei Elektroden, einer Platin-Elektrode und einer Ag/AgCl bzw. Hg/HgCl Referenzelektrode, die in die Proteinlösung eingetaucht wird. Damit das Potential der Lösung dem des Potentials in der Probe entspricht, muss die Lösung ständig gerührt oder lange equilibriert werden. Um eine möglichst schnelle und homogene Equilibrierung der Lösung zu erhalten, werden Mediatoren in einer Endkonzentration von 0,1 mM verwendet. Mediatoren sind niedermolekulare Redoxsysteme, die ein- oder zwei Elektronen aufnehmen bzw. abgeben können und den Kontakt zwischen Elektrode und Redoxzentrum des Proteins vermitteln. Das Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem

Spezies wird hierbei häufig auf spektroskopischem Wege ermittelt. Zur Bestimmung des Redoxpotentials mittels ESR-Spektroskopie wurde eine Apparatur nach Wilson und Dutton verwendet. In einer gewöhnlichen anaeroben Titration wurden ca. 2,5 ml einer 200 μM FrhB oder 40 μM FrhABG-Lösung in der Gegenwart der aufgelisteten Mediatoren (Tabelle 2) mit Natriumdithionit bzw. Kaliumhexacyanoferrat titriert. Das Potential wurde mit einer Ingold Pt 4805-S7/120 Platinelektrode ermittelt. Da das Ag/AgCl Bezugssystem in der Elektrode einer Parallelverschiebung des Standard Wasserstoffpotential (SHE) $E_{\text{H}} = E_{\text{gemessen}} + 207 \text{ mV}$ bei 25 °C verglichen mit der Standard Wasserstoffelektrode aufweist, wurde diese mit einberechnet. Nachdem das gewünschte Potential eingestellt war, wurden jeweils 270 μl -Proben entnommen, in kalibrierte ESR-Röhrchen (Quarzröhrchen (99,9% Quarz) der Quarzschmelze Ilmenau GmbH, Langewiesen), Innendurchmesser ca. 3–4 mm und ca. 0,5 mm Wandstärke) gefüllt. und mit flüssigem Stickstoff in einem Anaerobenzelt eingefroren. Die ESR-Messungen erfolgten wie in diesem Kapitel beschrieben. Die Proben wurden unter nicht gesättigter Mikrowellenleistung aufgenommen. Um ein bestmögliches Signal/Rausch-Verhältnis zu erhalten, wurden die Mikrowellen-Leistung und die Verstärkerstufe (gain) aufeinander abgestimmt. Die erhaltenen ESR-Spektren wurden mit dem Programm WINEPR, Version 2.11 (Bruker) ausgewertet (Çinkaya 2002).

Tabelle 2: Mediatoren.

Mediator	mV	löslich
Methylviologen	-449	Wasser
Benzylviologen	-358	Wasser
Safranin T	-289	Wasser
Antrachinon-2-Sulfonat	-225	DMSO
2-Hydroxy-1,4-Naphtochinon	-152	Ethanol
Menadion	-13	Ethanol

2.7 Einzelpartikel Cryo-Elektronenmikroskopie

Das Transmissionselektronenmikroskop (TEM) ermöglicht die direkte Abbildung von Objekten mittels Elektronenstrahlen. Als Elektronenquelle dient eine elektrisch aufgeheizte Kathode, die Elektronen emittiert. Diese werden von einer der Kathode gegenüberliegenden Anode beschleunigt, da diese eine Potentialdifferenz von $>10^5$ Volt aufweist. Eine Kondensorlinse fokussiert den Elektronenstrahl in die Objektebene. Die Elektronen treffen das zu betrachtende Objekt und werden anschließend durch eine zweite magnetische Linse (Objektivlinse) fokussiert. Die dritte Linse übernimmt die Aufgabe des Okulars im Lichtmikroskop und projiziert den Elektronenstrahl auf Negative oder dieser wird durch charge-coupled device (CCD)-Kameras in digitaler Form auf einen Computer übermittelt. Aufgrund der Elektronenwechselwirkungen mit dem Objekt lassen sich zwei unterschiedliche Streuungen unterscheiden: die elastische und die

unelastische Streuung. Unter der elastischen Streuung versteht man einen Vorgang der eintritt, wenn ein Strahlenelektron mit dem Kern eines Objektatoms elastisch interagiert. Dabei ist die Ablenkung der Elektronenbahn umso größer, je stärker die Coulomb-Kräfte wirken, d.h. je näher das negativ geladene Elektron dem positiv geladenen Atomkern kommt. Das gestreute Elektron wird in einer hyperbelförmigen Bahn auf das Atom hin beschleunigt. Dabei erfährt es bis zum kernnächsten Punkt eine Beschleunigung in Bewegungsrichtung und nach diesem Punkt eine entgegengesetzte zur Bewegungsrichtung. Da beide Komponenten der Beschleunigung gleich groß sind, ist die Geschwindigkeit vor und nach dem Streuvorgang gleich. Es kommt also zu keiner Energieveränderung und es entsteht ein Phasenkontrast im TEM. Die elastische Streuung ist für eine hohe Auflösung des Objektes entscheidend. Wird das Strahlenelektron von den Objektelktronen abgelenkt und erfährt gleichzeitig einen Energieverlust, spricht man von der unelastischen Streuung. Hier wird ein Teil der Energie auf den Atomkern übertragen. Das bedeutet, dass ein Teil der kinetischen Energie in Anregungsenergie überführt wird. Diese Elektronen liefern wichtige Informationen über Art und Zustand der Probeatome. Genauer gesagt kommt es zu einer Abnahme des Kontrastes und der Erkennbarkeit von Objektdetails. Die unelastische Streuung beruht auf der Coulomb-Wechselwirkung zwischen Strahlenelektronen und den Probenelektronen, hierbei erfolgt ein Energieaustausch. Auf Grund der annähernden Massengleichheit der beiden Elektronen bleiben die Probenelektronen nicht bewegungslos an ihrem Platz, wie man es für die Atomkerne annehmen kann, sondern sie werden selbst beschleunigt. Die Energie, die von den Strahlenelektronen übertragen wird, reicht aus um das Probenelektron in ein höheres Energieniveau zu heben oder aus der Hülle herauszuschleudern. Wird das Probenatom ionisiert, nimmt das Hüllenelektron die Ionisierungsenergie auf, die in der Größenordnung von 5–5000 Elektronenvolt (eV) liegt. Wenn das Primärelektron die Probe wieder verlässt, besitzt es einen um genau den Betrag der Ionisierungsenergie kleineren Energieinhalt. Damit trägt es aber auch Informationen über die Art und den Zustand des Probenatoms. Die Ionisierungsenergie der Hüllenelektronen ist charakteristisch für die einzelnen Elemente und hängt von der Ordnungszahl des Elements und der Herkunftsschale des Elektrons ab. Energiefilter können die unelastisch gestreuten Elektronen von der elastischen trennen und damit die Kontrastverhältnisse verbessern. Zur Abbildung auf dem Leuchtschirm im TEM werden alle durch die Probe hindurchtretenden Elektronen benutzt. Atome höherer Ordnungszahl streuen die Elektronen stärker, die Intensität der Elektronenstrahlung wird also geringer und diese Atome werden folglich dunkler abgebildet. Ungestreute und elastisch gestreute Elektronen mit kleinem Streuwinkel erzeugen einen hellen Untergrund, wodurch der Kontrast reduziert wird.

In einem Elektronenmikroskop muss ein hohes Vakuum herrschen, damit die Elektronen nach Objektdurchgang nicht von Gasmolekülen abgelenkt werden. Damit die Objekte vor Austrocknung geschützt sind, müssen diese vorher präparativ behandelt werden. Eine Möglichkeit stellt das Einfrieren dar. Diese Methode wird auch Einzelpartikel Cryo-Elektronen-Mikroskopie

(Cryo-EM) genannt. Die Cryo-EM stellt eine Methode dar, Makromoleküle und Zellbestandteile in nativer Form zu untersuchen. Die Probe wird für diese Methode vor der Betrachtung in einem Elektronenmikroskop virifiziert. Dazu wird die Probe in flüssiges Ethan, das auf ca. 100 K abgekühlt ist, geschlossen. Bei dieser Temperatur und der hohen Abkühlungsrate ($\sim 100.000^\circ\text{C s}^{-1}$) wird das Wasser der Probe virifiziert, das bedeutet es gefriert ohne dass sich Eiskristalle bilden können, welche die Probe beschädigen. Da elektronenmikroskopische Aufnahmen neben dem erwünschten Signal auch einen hohen Rauschanteil z.B. durch die Elektronenquelle, überlagerte Strukturen der Objektträgerfolie, Beträge durch das Filmmaterial, die Kamera usw. enthalten, ist eine große Anzahl von Einzelmoleküle nötig um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhöhen. Denn durch eine große Anzahl der Objekte (1.000–10.000 Einzelbilder) verringert sich das Rauschen zu einem konstanten und damit zu einem struktur- und informationslosen Beitrag. Das Ziel der Cryo-EM ist es, die 3D-Rekonstruktion eines Objektes zu erhalten. Dazu werden die erstellten Cryo-EM-Bilder, welche 2D-Projektionen eines 3D-Objektes darstellen, klassifiziert und ein vorläufiges 3D-Modell aus den errechneten Projektionswinkeln bestimmt. Dazu müssen die Orientierungen der Einzelpartikel differenzierbar sein. Durch Vergleich der Partikel mit dem vorläufigen Modell können diese nun in einer gefilterten Rückprojektion in ihrer Orientierung (Euler-Winkel) definiert werden, womit die Auflösung der 3D-Rekonstruktion verbessert wird. Das Verfahren wird solange mit dem 3D-Modell wiederholt, bis die Rekonstruktion und die Bestimmung der Projektionswinkel konsistent bleibt und ein endgültiges 3D-Modell erhalten wird.

2.7.1 Cryo-EM Elektronendichte Rekonstruktion und Prozessierung

3 μl einer 0,7 mg/ml homogenen FrhABG Probe wurden auf einen Quantifoil R1/4 Grid (Quantifoil Micro Tools) aufgetragen, der vorher für 15 s in Chloroform inkubiert wurde. Die Grids wurden für 2,5 s mit 70% Feuchtigkeit bei 10 °C in einem FEI Vitrobot geblottet, bevor sie in flüssigem Ethan bei 100 K schockgefroren wurden. Dadurch wird die Probe fixiert, ohne dass die Biomoleküle geschädigt werden. Um Daten mit Substrat-gebundener FrhABG aufzunehmen, wurde das Enzym mit 2,5, 5 oder 10 mM F_{420} unter anaeroben Bedingungen für 10 min inkubiert, bevor die Probe auf das Grid aufgetragen wurde.

Die Bilder wurden freundlicherweise von Deryck J. Mills (Max-Planck-Institut für Biophysik, Abteilung Strukturbiologie, Frankfurt am Main) an einem Elektronenmikroskop (FEI Tecnai Polara) bei 200 K aufgenommen. Die Bilder wurden auf einen Kodak SO-163 Film mit einer 59.000-fachen Vergrößerung und einer Dosis von 10–15 $\text{e}^-/\text{\AA}^2$ aufgezeichnet. Die Fokussierung erfolgte bei 1,5–2,8 μm . Der Film wurde anschließend für 12 min in Kodak D-19 Entwickler entwickelt und für 8 min in Kodak Rapid Fix fixiert.

Die Filme wurden an einem Zeiss Photoscan Scanner mit 7 μm Pixelgröße digitalisiert, dies entspricht 1,14 \AA , als Kalibrierung diente die Fettsäure Synthase (Gipson et al. 2010). Die Partikelauswahl erfolgte semiautomatisch mit dem Boxer Modul von EMAN (Ludtke et al. 1999),

die Datenprozessierung mit EMAN2 (Tang et al. 2007). Die Kontrasttransferfunktion der ausgewählten Partikel von jedem einzelnen Film wurde durch EMAN2 detektiert und diejenigen Bilder, die sogenannte Thon Ringe in dem Spektrum mit hoher Auflösung zeigten und keine Abweichungen bzw. kein Astigmatismus beobachtet werden konnte, wurden für weitere Prozessierungen ausgewählt.

Die Elektronendichte wurde mit einem anfänglichen tetrahedralen Modell verfeinert, welches in EMAN2 durch einige wenige Bilder konstruiert wurde. Ein endgültiger Datensatz aus 84.000 Partikeln von 101 Negativen, die aus 402 Negativen ausgewählt wurden, diente der Verfeinerung mit einem Fokus von 1,5–2,8 μm . Das Datenset FrhABG mit F_{420} bezog 97.000 Partikeln mit ein. In dem letzten Verfeinerungsschritt wurde ein Winkel von $0,9^\circ$ zwischen den fortlaufenden Projektionen gewählt. 2143 Referenzbilder führten zu einer Elektronendichte von ~ 4 Å bei einer Fourier Shell Correlation (FSC) von 0,5.

2.7.2 Modellbau

Der Modellbau, durchgeführt in COOT (Emsley und Cowtan 2004), erfolgte durch Dr. Janet Vonck (Max-Planck-Institut für Biophysik, Abteilung Strukturbiologie, Frankfurt am Main). Homologe Proteinstrukturen dienten als Modell, wobei die Aminosäuresequenz der Frh-Untereinheiten manuell in die Elektronendichte angepasst wurde. Für FrhA wurde die homologe bakterielle [NiFe]-Hydrogenase von *D. vulgaris* Hildenborough (PDB-Code: 2wpn, Sequenzidentität: 28%) gewählt. Dieses Modell wurde auch für den N-terminalen Teil von FrhG ausgewählt (Sequenzidentität: 28%). Für den C-terminalen Teil von FrhG wurde die Ferredoxin-Domäne von *Peptostreptococcus asaccharolyticus* (PDB-Code: 1dur, Sequenzidentität: 32%) als Modell herangezogen. Aminosäuren unbekannter Regionen der FrhA und FrhG Untereinheit und die gesamte FrhB Untereinheit wurden ohne Vorlage manuell in die Elektronendichte eingefügt. Dazu wurde eine Vorhersage der Sekundärstruktur mittels PSIPRED Server (Bryson et al. 2005) herangezogen. Wenn es möglich war, wurden Aminosäuren direkt in die Elektronendichte eingebaut.

2.7.3 Graphische Darstellung

Zur graphischen Darstellung der Molekülmodelle wurde das Grafikprogramm PyMOL (DeLano 2002) und CHIMERA (Pettersen et al. 2004) verwendet. Um Elektronendichten zu projizieren, wurde mit dem CCP4-Programmpaket (Potterton et al. 2002) die entsprechende Datei im map-Format erstellt und in PyMOL visualisiert.

2.8 Kristallographie

Grundlage

Die Strukturbestimmung von Molekülen mittels Röntgenstrukturanalyse beruht auf der Streuung von Strahlung an Elektronen und der Interferenz (Beugung) der gestreuten Wellen, die von verschiedenen Atomen eines Moleküls ausgehen. Max von Laue konnte im Jahre 1910 nachweisen,

dass der regelmäßige Aufbau eines Kristalls zusammen mit der groben Übereinstimmung zwischen interatomaren Abständen und den Röntgenwellenlängen zur Erzeugung von charakteristischen Beugungsmustern führt. Als Meilenstein zur Erklärung des Phänomens diente die „Ewald-Kugel“ (Ewald 1921), welche eine logische Beziehung zwischen dem Kristallgitter und dem reziproken Gitter herstellt.

Um eine Proteinstruktur zu lösen, werden prinzipiell sechs Schritte benötigt: (1) Bereitstellung von einem homogenen Protein, (2) das Finden von geeigneten Kristallisationsbedingungen, (3) die Datensammlung und Datenauswertung, (4) die Phasenbestimmung, (5) die Interpretation der Elektronendichtekarte, also das Erstellen eines atomaren Modells und (6) die Verfeinerung des Modells.

Einkristalle von Proteinen

Damit sich sogenannte Kristallkeime bilden können, die Grundvoraussetzung für die Züchtung makroskopisch sichtbarer Kristalle sind, muss das Protein durch die Zugabe eines geeigneten Fällungsmittels in den Sättigungsbereich überführt werden. Das weitere Wachstum der Kristallkeime sollte bei geringer Übersättigung stattfinden. Dadurch wird die Bildung weiterer Kristallkeime und die Anhäufung vieler kleiner Kristalle oder von Präzipitaten vermieden, so dass einige wenige große Kristalle entstehen können.

Ausgehend von dieser Theorie muss erwähnt werden, dass die Kristallisation von Proteinen von vielen Parametern abhängt, die erst nach einem „Versuch und Irrtum“ Prinzip ermittelt werden müssen, bevor durch gezielte Variationen dieser Parameter der Kristall möglicherweise optimiert werden kann. Zu den Parametern, die für die Kristallisation entscheidend sind, zählen die Konzentration des Proteins, die Art und Konzentration des/der Fällungsmittel(s), die zur Pufferung der wässrigen Lösung eingesetzten Substanz, der pH-Wert, die Temperatur sowie die Art und Konzentration eventuell notwendiger Additive. Die Kristallisation des Proteins mit den genannten Parametern kann in unterschiedlicher Weise durchgeführt werden. Die am häufigsten angewendete Methode ist die Dampfdiffusion. Hierbei wird hochkonzentrierte Proteinlösung mit einem Fällungsmittel (Präzipitans) versetzt und ein Konzentrationsgradient über ein Reservoir mit höherer Konzentration des Präzipitans erzeugt. Durch den langsamen Austausch des Lösungsmittels über die Dampfphase innerhalb des geschlossenen Systems kommt es zu einer gesättigten Proteinlösung, in der sich bei günstigen intermolekularen Wechselwirkungen Kristallisationskeime bilden können, an denen dann ein definiertes Kristallwachstum erfolgt.

Beugung von Röntgenstrahlen an Einkristallen

Die Elektronen der im Kristallgitter angeordneten Atome werden durch das Auftreffen von Röntgenstrahlen zur Schwingung angeregt. Dabei entspricht die Frequenz der Schwingung der Wellenlänge der einfallenden elektromagnetischen Welle. Diese Elektronen senden dann ihrerseits

elektromagnetische Strahlen derselben Frequenz aus. So ist die beobachtete Strahlung die Summe aller einzelnen von den Elektronen des Kristalls ausgesandten Wellen. In der Regel summieren sich diese Wellen zu null. Nur in ausgezeichneten Richtungen kommt es zu einer sogenannten konstruktiven Interferenz. Es entsteht eine zu null verschiedene Strahlung, die als scharfe Maxima (Reflexe) im Röntgenbeugungsmuster sichtbar werden.

Welche Bedingungen gelten, um eine konstruktive Interferenz zu erhalten, beschreibt das Bragg'sche Gesetz:

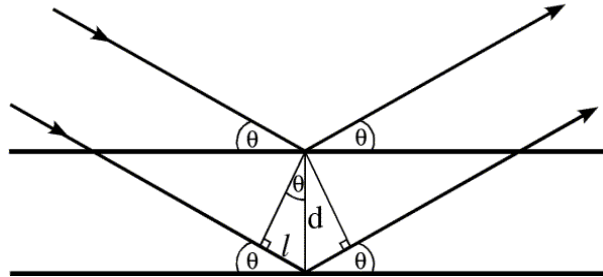


Abbildung 8: Das Bragg'sche Gesetz. Illustriert sind zwei Wellen, welche durch zwei angrenzende Ebenen mit dem Abstand d reflektiert werden. Bei konstruktiver Interferenz muss der Gangunterschied l ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge λ entsprechen.

Das Bragg'sche Gesetz baut auf der Vorstellung auf, dass jede Elementarzelle als Gitterpunkt beschrieben werden kann, deren Abstände von den Elementarzellenparametern abhängt. Die Gitterpunkte bauen ein dreidimensionales Gitter auf und die unterschiedliche Verknüpfung der Gitterpunkte führt zu unterschiedlichen Netzebenen, die den Abstand d voneinander haben. Die Beugung der Röntgenstrahlen mit der Wellenlänge λ und dem Winkel θ am Kristallgitter wird nun als eine Reflexion an einer Ebenenschar beschrieben. Damit ist es möglich, den Abstand dieser Ebenen und die Einheitszelle zu berechnen. Nach dem Bragg'schen Gesetz entspricht der maximale Beugungswinkel θ_{\max} (90°) dem kleinsten beobachtbaren Ebenen-Abstand d_{\min} , was der der maximalen Auflösung einer Struktur entspricht:

$$d_{\min} = \frac{\lambda}{2 \sin \theta}$$

Bei einer Wellenlänge von $1,0 \text{ \AA}$ entspräche dies einer maximalen Auflösung von $0,5 \text{ \AA}$. Aufgrund ihrer fehlerhaften Ordnung streuen Proteinkristalle jedoch selten besser wie $1,5 \text{ \AA}$.

Die Ewald-Konstruktion ist ein Hilfsmittel, um reziproke Gitterpunkte auf der Basis des Bragg'schen Gesetzes zu konstruieren:

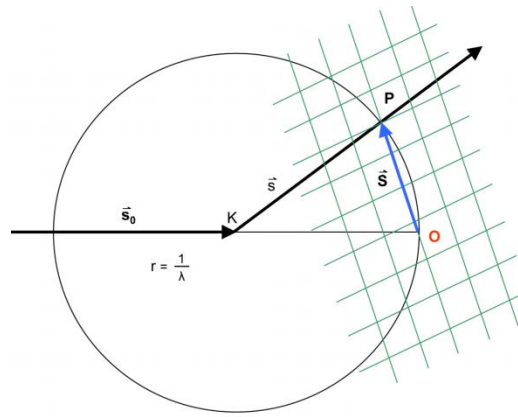


Abbildung 9: Die Ewald-Konstruktion. Im reziproken Raum wird der Kristall im Zentrum der Ewald-Kugel mit dem Radius $1/\lambda$ platziert. Der Ursprung des reziproken Gitters liegt im Schnittpunkt des Primärstrahls mit dem Kreis. Das reziproke Gitter bewegt sich mit der Drehung des Kristalls. Nur Reflexe, die auf der Ewald-Kugel liegen, sind auf dem Detektor messbar.

Die Konstruktion beschreibt eine Kugel, die einen Radius von $1/\lambda$ mit dem Kristall als Zentrum besitzt. Die Streuvektoren S der Ebenenschar bauen das reziproke Gitter auf. Deren Längen entspricht dem reziproken Abstand der Netzebenenschar. Das Bragg'sche Gesetz ist erfüllt, wenn die reziproken Gitterpunkte die Kugeloberfläche schneiden. Durch Drehung des Kristalls können nun alle reziproken Gitterpunkte auf der Ewald-Kugel generiert werden. Daher besteht im Regelfall eine Röntgenapparatur aus einer Röntgenstrahlquelle, einem Kristall der drehbar aufgehängt ist (Drehachse 90° zum Röntgenstrahl) und dem Detektor (z.B. Film oder CCD). Je nach Größe der Elementarzelle wird der Kristall um jeweils $0,5\text{--}2,0^\circ$ pro Aufnahme gedreht, um eine Überlappung der Reflexe auf dem Detektor zu vermeiden. Bei einer Messreihe werden etwa 1.000–500.000 solcher Reflexe gemessen und dabei Intensität und Lage bestimmt. Jeder Reflex wird mit den Miller'schen Indizes h, k, l gekennzeichnet, die sich aus den Schnittpunkten der Ebenen mit den Kristallachsen ergeben. Die Werte von (h, k, l) entsprechen dabei den reziproken Schnittpunktkoordinaten, wobei die Kristallachsen jeweils auf eine Länge von eins geeicht sind.

Da die Röntgenstrahlen an der Elektronenhülle der Atome gebeugt werden, ergibt die Röntgenstrukturanalyse nicht sofort die exakten Atomkoordinaten, die der Position der Atomkerne entsprechen, sondern die dreidimensionale Verteilung der Elektronen der Atome, die als Elektronendichte der asymmetrischen Einheit bezeichnet wird. Der Zusammenhang zwischen der Elektronendichte und den vermessenen Reflexen wird durch die Fouriertransformation hergestellt. Das Röntgenexperiment beinhaltet, dass die Wellen, die jedes Atom mit dem Atomformfaktor f und der Position xyz in eine bestimmte Richtung streut, interferieren. Die Summe dieses Überlagerungsprozesses bezeichnet man als Strukturfaktor $F(h, k, l)$:

$$F(h, k, l) = \sum f_i \exp(2\pi i (hx + ky + lz))$$

Im genau umgekehrten Prozess kann die Elektronendichte $\rho(x, y, z)$ für jeden Punkt im reellen Raum als eine Fourier-Sumation von allen Strukturfaktoren berechnet werden. Die Strukturfaktoramplitude $|F(h, k, l)|$ ist proportional zur Quadratwurzel der gemessenen Intensität I für den Reflex (h, k, l) und ist so bestimmbar. Das Volumen V der Einheitszelle ist aus den Einheitszellparametern berechenbar. Die Phase $\alpha(h, k, l)$ ist nicht zugänglich und muss aufwendig berechnet werden (siehe unten):

$$\rho(x, y, z) = 1/V \sum F(h, k, l) \exp(i\alpha(h, k, l)) (2\pi i (hx + ky + lz))$$

Das Phasenproblem

Zur Lösung des Phasenproblems werden in der Regel drei unterschiedliche Methoden angewendet: der isomorphe Ersatz (SIR/MIR), der molekulare Ersatz (MR) und die multiple anomale Dispersion (MAD).

Beim isomorphen Ersatz (SIR/MIR, single/multiple isomorphous replacement) werden Schwermetalle durch Tränken oder Cokristallisation in den Kristall eingebracht, wenn das Protein nicht über Metalle als Cofaktor verfügt. Je nach den chemischen Eigenschaften des Schwermetalls bilden sie zum Beispiel mit dem Protein eine kovalente Bindung, wie z. B. Hg^{2+} -Ionen mit der Sulfhydrylgruppe des Cysteins. Aufgrund ihrer hohen Anzahl an Elektronen und der damit erhöhten Streuintensität ändert sich der Strukturfaktor im Vergleich zu einem Kristall ohne Schweratom und die Differenz kann zur Phasenbestimmung genutzt werden. Die Position der Schweratome wird über die Differenzpattersonfunktion bestimmt, welche den Abstand zwischen den Schweratomen beschreibt. Mit der bekannten Symmetrie der Elementarzelle können die Positionen der Schweratome abgeleitet werden. Dies gelingt nur, wenn das Schweratom spezifisch an eine Stelle bindet und der Rest des Kristalls unverändert bleibt (Isomorphie). Bei der Verwendung von nur einem Schweratom ist allerdings der Phasenfehler noch recht groß. Dies kann durch ein zweites, unabhängiges Derivat gelöst werden, welches eine andere Schweratom-Bindungsstelle hat.

Bei der Methode des molekularen Ersatzes (MR, molecular replacement) wird die notwendige Phaseninformation von einer bereits bekannten Struktur mit hinreichender Ähnlichkeit zur aktuellen Struktur genutzt. Unter Verwendung der vom korrekt platzierten Suchmodell berechneten Phasen und der gemessenen Strukturfaktoramplituden wird dann eine Elektronendichteverteilung errechnet, die eine Strukturlösung des neuen Modells ermöglicht. Die Platzierung des Modells erfolgt wieder mit der Patterson-Funktion, wodurch die sechsdimensionale Suche in zwei dreidimensionale Prozesse (3 Rotations- und 3 Translationsparameter) aufgetrennt werden kann. Die richtige Positionierung beinhaltet zwei Schritte: Zum einen werden die Patterson-Vektoren rotiert, bis sie mit denen des gesuchten Moleküls übereinstimmen. Die Rotationsfunktion ergibt dann ein Maximum und die Rotationswinkel sind bestimmt. Zweitens wird das gesuchte Modell in kleinen Schritten durch die Einheitszelle translatiert, wobei nach jedem Schritt eine

Übereinstimmung zu den experimentellen Strukturfaktoren berechnet wird. Man kann nun die Phasen des bekannten Modells für das gesuchte Protein verwenden und somit die Elektronendichte des gesuchten Moleküls berechnen.

Die so genannte multiple anormale Dispersion (MAD, *multiple wavelength anomalous dispersion*) beruht auf der Anwendung anomaler Streuung. MAD erfordert eine frei wählbare Wellenlänge, die nur mit Synchrotronstrahlung einstellbar ist und das Vorhandensein von anormal streuenden Atomen im Kristall, welche natürlich im Protein vorkommen bzw. als Schweratomderivate analog zum isomorphen Ersatz präpariert werden. Die anormale Streuung ist als ein Resonanzphänomen zu verstehen, welches auftritt, wenn die einfallende Röntgenstrahlung eine Wellenlänge hat, welche einer der Absorptionskante der anormalen Atome entspricht. Eine Datensammlung wird nun bei der Wellenlängen des Peaks, des Wendepunkts und der höher energetischen Seite der Absorptionskurve durchgeführt (eventuell noch bei einer vierten Wellenlänge auf der niederenergetischen Seite). Es tritt dann durch Absorption der Röntgenstrahlung eine zusätzliche intrinsische Intensitätsänderung und Phasenverschiebung auf. Hierdurch wird der Strukturfaktor modifiziert und das Friedel'sche Gesetz bricht zusammen. Man beschreibt diesen Effekt durch Einführung eines dispersiven und absorptiven Korrekturterms f' und f'' . Das Ziel der MAD Methode ist es, die Unterschiede in den Bijvoet-Paaren und den dispersiven Komponenten zu maximieren, um daraus wiederum die Phase zu berechnen.

Interpretation der Elektronendichtekarte und Verfeinerung

Elektronendichtekarten entstehen aus den experimentell bestimmten Phasen α_{exp} und den gemessenen Strukturfaktoramplituden $|F_{\text{obs}}|$. Um die Qualität dieser Karte zu verbessern, die teilweise keine ausreichende Qualität aufweist, werden zusätzliche Informationen wie das Solvensglättungsverfahren eingebracht. Ist die Qualität der Elektronendichte ausreichend, erfolgt der Modellbau computergestützt am Graphikbildschirm. Dabei wird die Polypeptidkette unter Einbeziehung der bekannten Sequenz in die Elektronendichte eingepasst.

Die Phasen und damit die Elektronendichte können nun durch Verfeinerung des Modells weiter verbessert werden. Dabei werden die Modellparameter in einer Weise verändert, dass sich die daraus berechneten Strukturfaktoramplituden $|F_{\text{calc}}|$ in besserer Übereinstimmung zu den beobachteten Werten $|F_{\text{obs}}|$ befinden. Es werden neben den Positionen der einzelnen Atomen („positional refinement“) gleichzeitig auch die Temperaturfaktoren angepasst („B-factor refinement“). Dieser Zyklus wird in der Regel bis zur Konvergenz wiederholt. Da das Verhältnis zwischen den observablen Strukturfaktoren und den zu bestimmenden Parametern im Normalfall ungünstig ist, werden geometrische Informationen wie Bindungslänge und Bindungswinkel noch als zusätzliche Observable eingeführt.

Als Maß für die Qualität des Modells dient der kristallographische R-Faktor:

$$R_{\text{krys}} = \frac{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}}(hkl) - k \cdot F_{\text{calc}}(hkl)|}{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}}(hkl)|}$$

Die Aufgabe der Verfeinerung besteht darin, den R-Faktor unter Berücksichtigung der geometrischen Parameter zu minimieren. Als zusätzliches Kriterium für den Erfolg der Verfeinerung dient der „freie R-Faktor“ (Brunger 1992). Ein großes Problem bei der Verfeinerung ist das sogenannte „over-fitting“, bei dem durch Modelländerungen zwar der R-Faktor, aber nicht das Modell verbessert wird. Für die Bestimmung des freien R-Faktors werden 5% bzw. 10% der Reflexe zufällig ausgewählt und als Testset bei der Minimierung nicht mit einbezogen. Berechnet werden also zwei R-Faktoren, der Konventionelle und der Freie. Im Regelfall liegt der freie R-Faktor, der vor einer Überanpassung des Atommodells warnt, um ca. 2–5% höher.

2.8.1 Kristallisation und Substrattränkung

Die Kristallisation des FrhABG Komplexes erfolgte bei 8°C unter strikt anaeroben Bedingungen in einem anaeroben Zelt (Coy Laboratory Products) mit einer N₂/H₂ (95%/5%) Atmosphäre. Für die Kristallisation des nativen FrhABG Komplexes wurde die Methode des „sitzenden Tropfens“ gewählt. Dazu wurde der Proteintropfen (15 mg/ml) 1:1 mit 1 µl Reservoirlösung gemischt und als sitzender Tropfen in Kristallisationsplatten mit 24 Vertiefungen (JB, Jena Bioscience GmbH, Jena) zusammen mit der Mutterlösung inkubiert. Für das Kristallscreening wurden über 1000 verschiedene Bedingungen getestet. Unter Anderem wurden verschiedene Kristallisationsscreens herangezogen: JBScreen Classic 1–10, JBScreen Membrane 1–3, JBScreen Pentaerythritol 1–4 (JB), Sigma Crystallization Basic Kit und Sigma Crystallization Extension Kit (Sigma-Aldrich, Seelze). Für einen weiteren Optimierungsprozess wurden neben der Veränderung der Salz- und Präzipitankonzentrationen und der Feineinstellung des optimalen pH-Wertes auch Additiv-Screens verwendet: JBScreen Additives, JBScreen Kosmotropic, JBScreen Volatiles (JB) und Hampton Research Additive Screen (Hampton Research, Aliso Viejo/USA). Anschließend wurde der Kristallisationsbedingung noch 5% Glycerin hinzugefügt, so dass auf einen Cryo-Schutz beim Einfrieren der Kristalle verzichtet wurde. Die optimale Kristallisationsbedingung setzt sich wie folgt zusammen: 17–20% PEE 797 (JB), 400 mM MgCl₂, 100 mM Trimethylamine N-Oxide (JB), 5% Glycerin, 100 mM MES pH 6,5. Dunkelbraune Kristalle mit einem Durchmesser von 0.4 x 0.4 x 0.4 mm wuchsen nach ca. 2–3 Wochen. Beim Einfrieren der Kristalle wurde darauf geachtet, dass die Entfernung des Stickstoffstroms zum Kristall <1cm betrug. Um ein gleichmäßiges Einfrieren der Kristalle zu gewährleisten, wurde der Stickstoffstrom nach Montage des Kristall-Loops an den Diffraktometer gleichmäßig und sehr schnell reguliert.

Für das Tränken der Kristalle mit Substrat wurde eine 10 mM F₄₂₀-Stammlösung von in 100 mM MES pH 6,5 hergestellt. Anschließend wurden Kristallisationspuffer mit unterschiedlichen

F₄₂₀ Konzentrationen (50 µM, 100 µM, 500 µM und 1mM F₄₂₀) vorbereitet. Der Kristall wurde in eine Lösung bestehend aus 5 µl Kristallisationspuffer mit 50 µM F₄₂₀ überführt und dort 15 min inkubiert. Anschließend wurde die F₄₂₀ Konzentration stufenweise (50, 75, 150, 300, 600 µM) auf 1 mM F₄₂₀ erhöht. So wurde gewährleistet, dass sich der Kristall an die veränderten Bedingungen adaptieren konnte. Dasselbe Verfahren wurde ebenfalls zur Oxidation mit 1 mM Kaliumhexacyanoferrat und zur Reduktion mit 1 mM Na-Dithionit angewendet. Ferner wurde versucht, den FrhABG Komplex sowohl unter reduzierten Bedingungen (Zelt-Atmosphäre), als auch mit 1 mM Kaliumhexacyanoferrat in Anwesenheit von 2 mM F₄₂₀ zu kristallisieren.

2.8.2 Datensammlung und Datenreduktion

Anormale und native Röntgendiffraktionsdaten wurden an der Messstation PXII am SLS (Swiss Light Source, Villigen, Schweiz) gesammelt. Der Kristall - Detektor Abstand bei der nativen Messung betrug 370 mm und bei der Messung an der Eisenkante 250 mm. Der native Datensatz wurde bei 0,9958 Å, diejenigen an der Eisenkante bei 1,7386 Å vermessen. Die Rotation pro Streubild betrug 0,25° bei einer Belichtungszeit von 1 s. Alle Bilder wurden mit dem Programm XDS (Kabsch 2010) indiziert, integriert und skaliert. Die Raumgruppe wurde aus den Positionen der Reflexe bestimmt. Danach wurden in XSCALE verschiedene Teildatensätze aufeinander skaliert, die Intensität in Strukturfaktoren umgewandelt und die Friedel-Paare zusammengefasst.

2.8.3 Zwillings-Faktor des Kristalles

Einkristalle bestehen aus einer großen Zahl von Einheitszellen, die durch Translationen entlang der Kanten den gesamten Kristall aufbauen. Mit Ausnahme der Raumgruppe P1 besitzen alle Einheitszellen eine interne Symmetrie, die durch bestimmte Symmetrioperationen beschrieben werden. Die Grundeinheit, aus der die Elementarzelle mit Hilfe der Symmetrioperatoren aufgebaut werden kann, nennt man asymmetrische Einheit. Manche Kristalle liegen jedoch nicht als Einkristalle sondern als verzwilligte Kristalle vor. Mehrere Kristalle des gleichen Proteins sind miteinander verwachsen und haben eine bestimmte gegenseitige Ausrichtung zueinander. Das Reflexprofil besteht aus zwei oder mehreren reziproken Gittern, die miteinander überlappen.

$$k_m I_{hkl}(\text{Kristall}_1) + (1-k_m) I_{h'k'l'}(\text{Kristall}_2)$$

Man unterscheidet zwei verschiedene Typen der Verzwilligung. Im ersten Fall überlappt sich das Beugungsmuster des Zwillingskristalls nicht und die beiden reziproken Gitter sind im Prinzip trennbar und prozessierbar. Im zweiten Fall überlappt das Beugungsmuster des Zwillingskristalls vollständig, dann spricht man von merohedralen Zwillingen bzw. von hemihedrale Zwillingen, wenn nur ein Symmetrioperator zwischen den überlappten Gittern besteht. Dadurch findet man für den Kristall eine höhere Symmetrie als tatsächlich vorhanden ist. Im Falle des FrhABG Komplexes lag der zweite Typ vor und die Daten wurden in der Raumgruppe F432 indiziert, obwohl die Kristalle die Raumgruppe F23 haben. Zum Glück war die hemihedrale Verzwilligung bei FrhABG nicht perfekt; der Zwillingsfaktor betrug etwa zwischen 20 und 50%.

Um den Zwillings-Faktor der prozessierten Daten zu erhalten, wurde der „Merohedral Twin Detector“ (Padilla und Yeates 2003) verwendet.

2.8.4 Lösung des Phasenproblems

Da FrhABG über mehrere FeS-Zentren verfügt und Fe sich ausgezeichneter als anomaler Streuer eignet, kann die MAD Methode zur Phasenbestimmung eingesetzt werden. Der Proteinkristall wurde bei einer Wellenlänge von 1,7386 Å, der spezifischen Absorptionskante des Eisens (Fe K α), vermessen (Hendrickson et al., 1988).

Die Position der Eisenatome der [4Fe4S]-Cluster wurde mit dem Programm SHELXD (Schneider und Sheldrick 2002) aus den anormalen prozessierten Daten des Kristalls frh36p1 in der Elementarzelle detektiert. Die erste Verfeinerung der Positionen und die Phasenbestimmung erfolgte mit SHARP (La Fortelle und Bricogne 1997) bei einer Auflösung 2,5 Å. Die erhaltenen Phasen wurden anschließend mit Hilfe des Solvensglättungsprogramms SOLOMON verbessert. Da nur Teile der vermessenen Daten (frh36p1) aufgrund des Zwillingsproblems ausgewertet werden konnten, war die Qualität der erhaltenen Elektronendichte noch nicht ausreichend, um das Modell zu bauen. Da zu diesem Zeitpunkt bereits eine Cryo-EM Dichte bei ~4 Å vorlag, wurden die SAD- und Cryo-EM-Phasen (FT der Cryo-EM-Dichte) kombiniert und Solvens geglättet. Für die Strukturfaktoramplitude stand der native Datensatz frh36 zur Verfügung. Die erhaltene Elektronendichte bei 2,5 Å war nun interpretierbar.

2.8.5 Modellbau und Verfeinerung

Um das Proteinmodell für FrhABG entsprechend der erhaltenen Elektronendichte zu bauen, wurde das Grafikprogramm COOT verwendet. Homologe Proteinstrukturen dienten als Modell und erlaubten das Polypeptidrückrad zu bauen. Die Aminosäuresequenz der FrhABG Untereinheiten wurde dann manuell in die Elektronendichte eingepasst. Für FrhA wurde die homologe bakterielle [NiFe]-Hydrogenase von *A. vinosum* (PDB-Code: 3myr, Sequenzidentität: 28%) gewählt. Dieses Modell wurde auch für den N-terminalen Teil von FrhG ausgewählt (Sequenzidentität: 28%). Für den C-terminalen Teil von FrhG wurde die Ferredoxin-Domäne von *Peptostreptococcus asaccharolyticus* (PDB-Code: 1dur, Sequenzidentität: 32%) verwendet. Das FrhB-Modell, das durch Cryo-EM generiert wurde, diente als Vorlage beim Bau dieser Untereinheit. Aminosäuren unbekannter Regionen von FrhA, FrhG und FrhB wurden ohne Vorlage manuell in die Elektronendichte eingefügt. Ein unvollständiges Modell konnte so eingebaut werden. Dieses Modell wurde nun in PHENIX als Vorlage aufgenommen und mit Hilfe der Strukturfaktoren und Phasen automatisch ein Modell zu generieren. Das neue, verbesserte Modell wurde nun mit dem Programm REFMAC5 (Murshudov et al. 1997) des CCP4-Programmpakets verfeinert. Dabei wurden die Atomkoordinaten und der B-Faktor variiert und das Zwillingsgesetz mit einbezogen. Die $(2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}})$ -Elektronendichtekarte und die $(F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}})$ Differenz-Fourierkarte, die die Unterschiede zwischen dem Modell und den gemessenen Daten anzeigten, dienten zur weiteren manuellen

Verbesserung des Modells. In mehreren Durchgängen wurde so das Proteinmodell der tatsächlich vorliegenden Struktur angenähert. Der Erfolg der Verfeinerung wurde mit R_{frei} , den dihedralen Winkeln und Peaks in der Differenz-Fourier-Karte, und im Ramachandran-Plot verfolgt. Die geometrische Qualität aller erhaltenen Datensätze wurde mit den Programmen COOT und PROCHECK überprüft.

2.8.6 Graphische Darstellung

Zur graphischen Darstellung der Molekülmodelle wurde das Grafikprogramm PyMOL verwendet. Um Elektronendichten zu projizieren, wurde mit dem CCP4-Programmpaket die entsprechende Datei im map-Format erstellt und in PyMOL visualisiert.

3 Ergebnisse

Der Ergebnissteil der vorliegenden Arbeit ist in vier Teile gegliedert. Der erste Teil befasst sich mit der homogenen Aufreinigung und der detaillierten biochemischen Charakterisierung von FrhABG aus *M. marburgensis*. Im zweiten Teil wird die Strukturaufklärung des FrhABG Komplexes mittels Cryo-EM zu einer einmaligen Auflösung von ~ 4 Å beschrieben. Der dritte Teil handelt von der röntgenkristallographischen Struktur des FrhABG Komplexes mit einer Auflösungsgrenze von 1,8 Å. Im letzten Teil schließlich wird FrhB als F_{420} -bindende Untereinheit charakterisiert.

3.1 Aufreinigung und kinetische Eigenschaften von FrhABG

Zwar wurden in der Vergangenheit bereits Aufreinigungen von FrhABG publiziert (Baron und Ferry 1989a; Fiebig und Friedrich 1989; Jacobson et al. 1982a; Muth et al. 1987a; Braks et al. 1994; Fox et al. 1987; Michel et al. 1995a), jedoch erfolgten diese nicht unter strikt anaeroben Bedingungen, außer die Aufreinigung der selenhaltigen F_{420} -reduzierenden [NiFeSe]-Hydrogenase von *Methanococcus voltae* (Sorgenfrei et al. 1997a). Aerob gereinigte FrhABG wurde durch Zugabe von Na-Dithionit reaktiviert um anschließend die F_{420} -reduzierende Aktivität zu messen. Da jedoch nicht auszuschließen ist, dass es durch die Inkubation mit Sauerstoff zu Schädigungen der [4Fe4S]-Cluster bzw. des [NiFe]-Zentrums kommt, wurde zu Beginn dieser Arbeit eine anaerobe Aufreinigung des FrhABG Komplexes etabliert, da die bereits publizierten Aufreinigungen unter anaeroben Bedingungen nicht reproduziert werden konnten. Die so erhaltene spezifische Aktivität ist um ein vielfaches höher, als die von aerob gereinigtem Enzym. Am Anfang der neuen Aufreinigung wurden unterschiedliche Aufschlussmethoden, wie French-Press und Ultraschall, miteinander verglichen. Die Wahl fiel auf die Zellöffnung mittels French-Press, da sich die beiden genannten Methoden nur durch den zeitlichen Aufwand unterschieden. Die French-Press stellt die zeitlich weniger intensive Methode dar. Der multimere Komplex aus Heterotrimeren ist so groß, dass er bei Ultrazentrifugation sedimentiert. Jedoch kann eine Membranverankerung, wie früher angenommen (Braks et al. 1994), durch Sequenzanalysen ausgeschlossen werden. So wurden nach Zellaufschluss nur die Zelltrümer, nicht aber die Membranen mittels Ultrazentrifugation entfernt. Eine Anreicherung des FrhABG Komplexes durch Langzeit-Ultrazentrifugation führte zu Aggregaten zwischen FrhABG und anderen Proteinen, die nicht mehr getrennt werden konnten. Deshalb wurde diese effektive Methode nicht in die Aufreinigungsprozedur mit aufgenommen. Die ersten Aufreinigungsschritte des FrhABG Komplexes erfolgten daher mittels hydrophober Phenyl-Sepharose Interaktions-chromatographie, gefolgt von Sephacryl S-400-Größenausschlusschromatographie. Das Einengen des großen Elutionsvolumens und das Entsalzen der Proteinlösung mit einem geeigneten Puffer für die Sephacryl S-400-Chromatographie konnte nicht mit einer Druckdialyse erfolgen, da der hohe Druck sich negativ auf die F_{420} -reduzierende Aktivität auswirkte. Die Konzentration erfolgte deshalb mittels Ultrafiltration, dies stellt eine schonendere Methode für die Aufrechterhaltung der Aktivität dar. Hierfür wurden 100 kDa Filter verwenden, die gleichzeitig einen Ausschluss kleinerer Proteine gewährleisten.

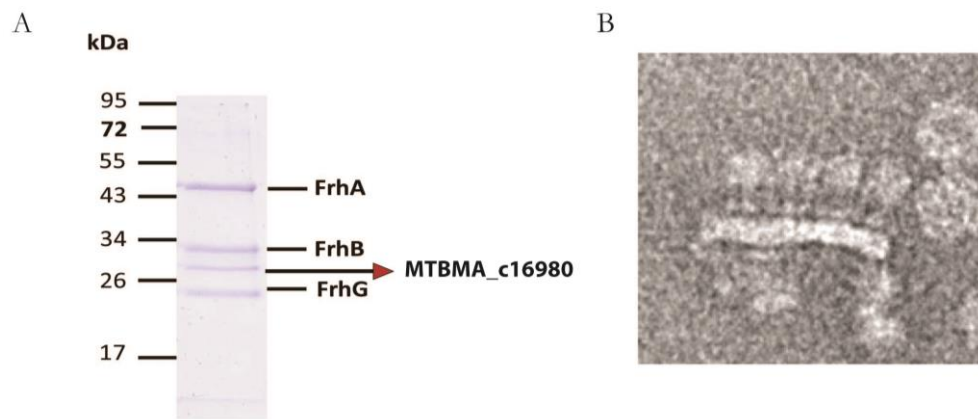


Abbildung 10: Aufreinigung von FrhABG ohne die Zugabe von CHAPS und Na-Dithionit. A: Kontamination der FrhABG Untereinheiten mit einem Protein, das Sequenzähnlichkeit zu einem Proliferierenden-Zellkern-Antigen (pcnA; Gen ID: MTBMA_c16980), visualisiert mit SDS-PAGE und analysiert mit MALDI-TOF-MS. Die Verunreinigung tritt auf, wenn kein CHAPS und Na-Dithionit während der Aufreinigung verwendet wird. B: *Negative stained* EM Aufnahmen mit 0,68 mg/ml Protein, zeigen FrhABG mit einem ATPase-ähnlichem Protein, das alle Untereinheiten einer intakten ATPase aufweist und teilweise noch in der Membran verankert ist.

Auf die Zugabe von frischem Na-Dithionit (4 mM) und CHAPS in allen weiteren Schritten konnte nicht verzichtet werden. Die Zugabe war nötig, um den FrhABG Komplex von anderen Proteinen (Abbildung 10) oder aus Aggregaten mit anderen FrhABG Komplexen (Abbildung 12 A) zu lösen, um eine homogene Präparation zu erhalten. Bei dem kontaminierenden Protein mit einer Masse von ca. 28 kDa handelt es sich um ein Protein mit Sequenzähnlichkeit zu einem Proliferierenden-Zellkern-Antigen (pcnA; Gen ID: MTBMA_c16980; Abbildung 10 A), dessen codierendes Gen im Genom von *M. marburgensis* ca. 8 kB von dem *frhAGBD*-Operon entfernt liegt. Auch konnte ein ATPase-ähnlicher Proteinkomplex nachgewiesen werden (Abbildung 10 B). Eine optimale Trennung der Aggregate erfolgte bei einer Inkubation von 0,6 mg CHAPS pro mg Protein für 12 Stunden. Es kam bei den verwendeten Konzentrationen sowohl von Na-Dithionit als auch von CHAPS zu keinem Aktivitätsverlust (Abbildung 11).

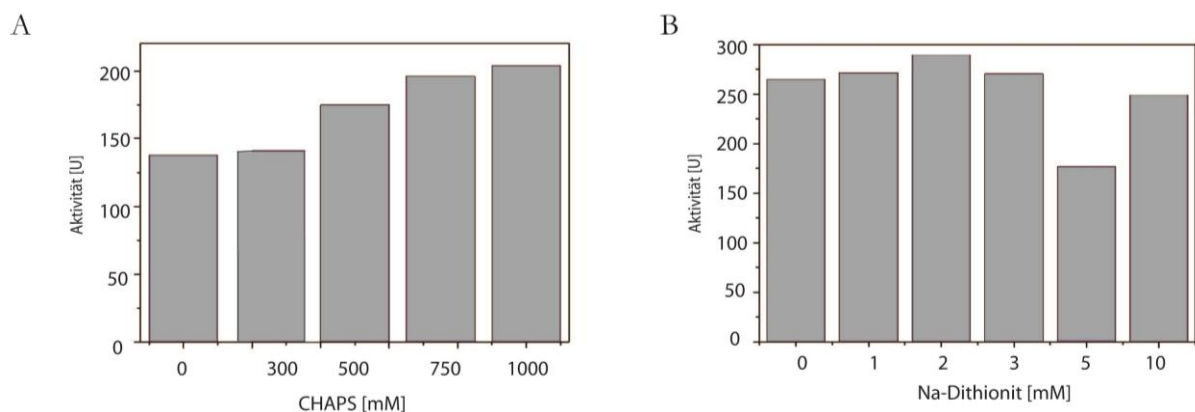


Abbildung 11: F₄₂₀-reduzierende Aktivität bei Anwesenheit von CHAPS und Na-Dithionit. Zellextrakt von *M. marburgensis* wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von CHAPS (A) bzw. Na-Dithionit (B) für 12 h bei Raumtemperatur und unter leichtem Rühren inkubiert. Anschließend wurde die F₄₂₀-reduzierende Aktivität mit H₂ bestimmt. Die Assays wurden bei 65°C in anaeroben 1,5 ml Küvetten durchgeführt, die 0,68 ml 100 mM HEPES Puffer (pH 7,5) und 100% H₂ in der Gasphase enthielten. Die Assays enthielten des Weiteren: 40 µM F₄₂₀ und 10 µM Na-Dithionit. Die Reduktion wurde durch Zugabe von 1–10 µg Zellextrakt gestartet und photometrisch bei 401 nm verfolgt.

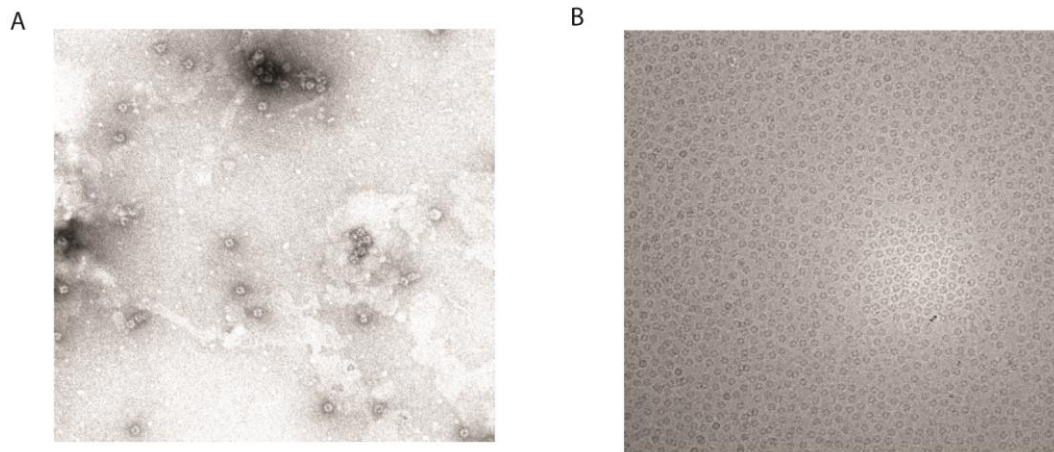


Abbildung 12: Effekt der zweiten Sephadryl S-400-Größenausschlusschromatographie, visualisiert mit EM. A: 0,1 mg/ml Protein nach MonoQ, visualisiert mit *negative stained* EM. B: 2 mg/ml Protein nach der zweiten Sephadryl S-400, visualisiert mit cryo-EM.

Für die Reinigung war auch die Anwesenheit von FAD notwendig, um die F_{420} -reduzierende Aktivität über den gesamten Aufreinigungsverlauf aufrecht zu erhalten. *Negative stained* EM-Aufnahmen haben gezeigt, dass die Präparation nach der MonoQ aus einem heterogenen Proteingemisch aus FrhABG Trimeren, einzelnen vollständigen FrhABG Komplexen und aus Aggregaten von FrhABG Komplexen besteht (Abbildung 12 A), was bereits in früheren EM Aufnahmen von Wackett *et al.* 1987 (Wackett et al. 1987b) beschrieben wurde. Der homogene FrhABG Komplex wurde nur durch eine zusätzliche Größenausschlusschromatographie erhalten (Abbildung 12 B).

Tabelle 3 Aufreinigung des FrhABG Komplexes aus *M. marburgensis*. Nach der 1. Sephadryl S-400 erfolgte die Zugabe von CHAPS (0,6 mg/mg). Anschließend wurde die Proteinlösung unter Rühren für 12 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Aktivität wurde durch die Reduktion von F_{420} mit H_2 bestimmt. Die Assays wurden bei 65°C in anaeroben 1,5 ml Küvetten durchgeführt, die 0,68 ml 100 mM HEPES/HCl pH 7,5 und 100% H_2 in der Gasphase enthielten. Die Assays enthielten des Weiteren: 40 μ M F_{420} und 10 μ M Na-Dithionit. Die Reduktion wurde durch Zugabe von 1–20 μ g Protein gestartet und photometrisch bei 401 nm verfolgt.

	Aktivität (U)	Protein (mg)	Spezifische Aktivität (U/mg)	Anreicherung (Faktor)	Ausbeute (%)
Zellextrakt	3800	1400	2,7	1	100
Phenyl-Sepharose	3500	170	21	7,8	92
1. Sephadryl S-400	2800	50	56	21	74
MonoQ	1680	6	260	96	44
2. Sephadryl S-400	1120	4	280	100	29

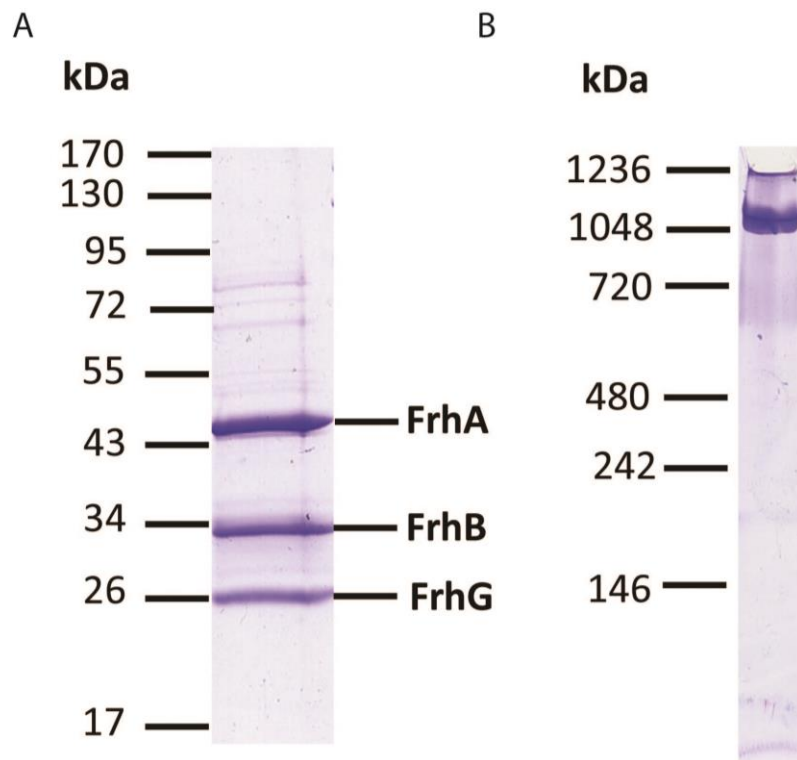


Abbildung 13: FrhABG Komplex aus *M. marburgensis* visualisiert mit SDS-PAGE und Native-PAGE.
 A: ~20 µg Protein nach der zweiten Sephacryl S-400 (Molekularer Massen Standard „Prestained“, Fermentas), B: ~50 µg Protein nach der zweiten Sephacryl S-400, (Molekularer Massen Standard, Invitrogen).

Eine homogene Anreicherung des F_{420} -reduzierenden FrhABG Komplexes aus dem thermophilen Archaeon *M. marburgensis* wurde nach 100-facher Anreicherung mit einer spezifischen Aktivität von 280 U/mg erhalten (Tabelle 3). Eine vergleichbare Aktivität bei früheren Aufreinigungen konnte nur bei der selenhaltigen F_{420} -reduzierenden [NiFeSe]-Hydrogenase erzielt werden (Sorgenfrei et al. 1997a), alle anderen in der Vergangenheit beschriebenen Aktivitäten von aufgereinigter FrhABG waren deutlich niedriger. Eine erfolgreiche Proteinaufreinigung enthielt einen F_{420} -reduzierenden Komplex mit einer apparenten Molekularmasse von >1000 kDa, der die drei Untereinheiten A, B und G in einem Verhältnis von 1 zu 1 zu 1 enthielt (Abbildung 13). Die Untereinheiten entsprachen in ihrer molekularen Masse etwa den aus der Primärsequenz Errechneten. Der Erfolg der Aufreinigung wurde standardmäßig durch SDS-PAGE sichtbar gemacht (Abbildung 13 A). Die Untereinheiten wurden des Weiteren durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie sequenziell identifiziert.

Der FrhABG Komplex katalysiert die Reduktion von F_{420} mit H_2 mit maximalen spezifischen Aktivitäten bei pH 7,5 und einer optimalen Temperatur von 70°C (Abbildung 14 A). Die F_{420} -reduzierende Aktivität des FrhABG Komplexes mit 100% H_2 in der Gasphase gehorcht der kinetischen Eigenschaft des Michaelis-Menten-Modells. So wurde ein hyperbolischer Zusammenhang der F_{420} -reduzierenden Aktivität mit steigender F_{420} -Konzentration, bis zu einem Maximalwert (V_{max}) beobachtet.

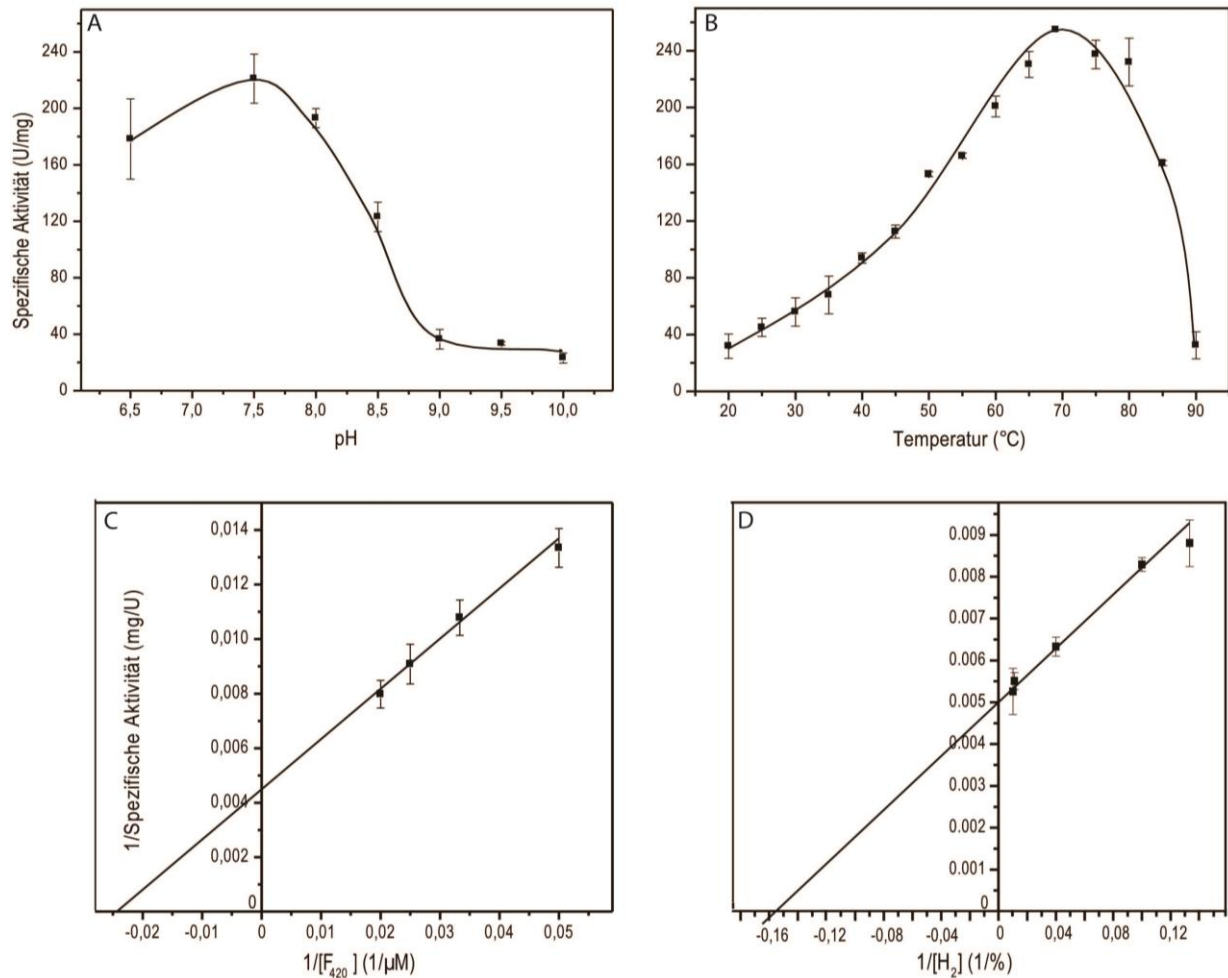


Abbildung 14: Kinetische Eigenschaften des FrhABG Komplexes. (A) pH- und (B) Temperatur-Optima des gereinigten FrhABG Komplexes bei der F_{420} -reduzierenden Aktivität mit H_2 und (C) Lineweaver-Burk Auftragung der F_{420} -abhängigen Reduktion mit H_2 gegen die Konzentration von F_{420} bzw. (D) gegen H_2 . Die Assays wurden bei 65°C (A, C, D) oder wie angegeben (B) in anaeroben 1,5 ml Küvetten durchgeführt, die 100% H_2 in der Gasphase enthielten (A, B, C) oder wie angegeben (D). Der anaerobe Testansatz enthielt des Weiteren: 0,68 ml 100 mM HEPES/HCl pH 7,5 (B, C, D) oder (100 mM MES/NaOH bei pH 6,5; 100 mM HEPES/HCl bei 7,0–8,0; 100 mM Tris/HCl bei pH 8,5, 100 mM Capso/HCl bei pH 9,0, 9,5, 10,0), 40 μM F_{420} (A, B, D) oder wie angegeben (C) und 10 μM Na-Dithionit. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms (1–10 μg) gestartet. Die Reduktion von F_{420} zu $F_{420}H_2$ durch den FrhABG Komplex wurde bei einer Wellenlänge von 401 nm verfolgt. Aufgrund der Autoreduktion des F_{420} mit Na-Dithionit bei niedrigen pH-Werten war es nicht möglich, Aktivitäten bei Werten $<\text{pH } 6,5$ zu messen.

Die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit wurde bei Substratkonzentrationen von 30–40 μM F_{420} erreicht (Abbildung 14 C) und ist damit ähnlich zu der Substratkonzentration die für *Methanobacterium formicicum* beschrieben wurde (Baron und Ferry 1989a). Der apparente K_m für die H_2 -Konzentration betrug etwa 6–10% in der Gasphase bei einer Konzentration von 40 μM F_{420} (Abbildung 14 D) und ist ähnlich zu dem beschriebenen Wert von MvhADG/HdrABC (Kaster et al. 2011). Jedoch ließ sich trotz der Verwendung von Perbunanstopfen kein exakter K_m Wert für H_2 ermitteln.

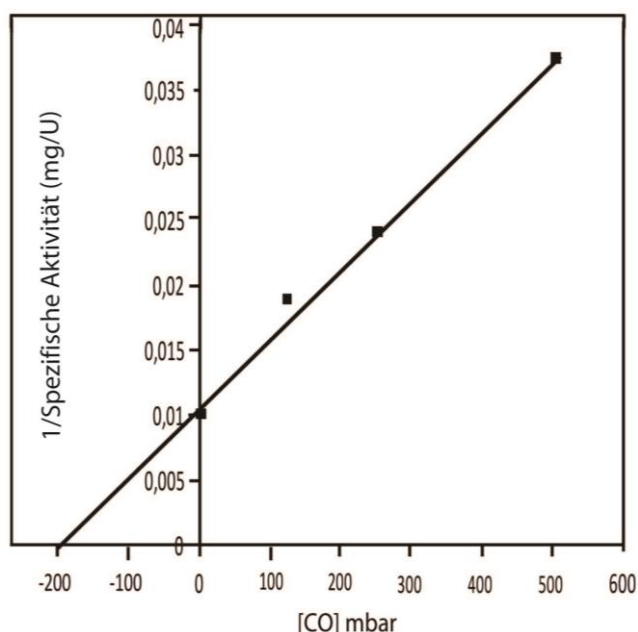


Abbildung 15: Dixon Plot der CO-Inhibition der F_{420} -reduzierenden Aktivität mit H_2 des gereinigten FrhABG Komplexes. Die Enzymtests wurden bei 65°C in anaeroben 1,5 ml Küvetten durchgeführt, die 100% H_2 in der Gasphase bzw. wie angegeben ein Gemisch aus H_2 und CO enthielten. Der anaerobe Testansatz enthielt des Weiteren 0,68 ml 100 mM HEPES/HCl pH 7,5, 40 μ M F_{420} und 10 μ M Na-Dithionit. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms (1–10 μ g) gestartet. Die Reduktion von F_{420} zu $F_{420}H_2$ durch den FrhABG Komplex wurde bei einer Wellenlänge von 401 nm verfolgt.

Kohlenstoffmonoxid (CO) ist nicht nur im aktiven Zentrum von [NiFe]-Hydrogenasen als Ligand des Eisens zu finden, sondern hemmt diese auch. Aus diesem Grund wurde auch der FrhABG Komplex auf eine inhibitorische Wirkung von CO untersucht. Die halbmaximale Inhibition (K_i) der F_{420} -reduzierenden Aktivität des FrhABG Komplexes ist bei 200 mBar CO zu beobachten (Abbildung 15).

Zur Ermittlung der Redoxpotentiale für die [4Fe4S]-Cluster des FrhABG Komplexes wurden Redoxtitrationen in Gegenwart von Mediatoren durchgeführt und mittels ESR-Spektroskopie verfolgt. Dazu wurden die Proben unter anaeroben Bedingungen sukzessive entweder mit Kaliumhexacyanoferrat oxidiert, oder mit Na-Dithionit reduziert. Dabei wurde ein Spektrum von +37 bis -433 mV abgedeckt. Aufgrund der hier erhalten Daten konnte die eindeutige Zuordnung der Redoxpotentiale für die unterschiedlichen [4Fe4S]-Cluster in FrhABG nicht erfolgen (Abbildung 16). Vielmehr wurde durch die Redoxtitration ersichtlich, dass die Redoxpotentiale aller [4Fe4S]-Cluster wohl sehr nah beieinander liegen. Eine Mittelpunktbestimmung war aufgrund des sehr negativen Redoxpotentials ebenfalls nicht möglich. Die ersten ESR Signale, die charakteristisch für [4Fe4S]-Cluster sind, wurden bei Werten unter -380 mV detektiert. Für die F_{420} -reduzierende [NiFeSe]-Hydrogenase von *M. voltae* wurde in einer anderen Arbeit ein Potential von -370 mV bestimmt (Bingemann und Klein 2000b) und ist damit ähnlich zu dem von FrhABG. In dieser Arbeit wurden für die [4Fe4S] $^{1+}$ -Cluster ein rhombische Signal mit g -Werte von $g_z = 2,059$, $g_y = 1,933$ und $g_x = 1,888$ bestimmt. Das ESR-Spektrum zeigt neben dem reduzierten [4Fe4S] $^{1+}$ -Cluster eine Radikalspezies ($g = 2,004$), diese stellt wahrscheinlich die radikalische Form von Methylviologen bzw. Benzylviologen dar.

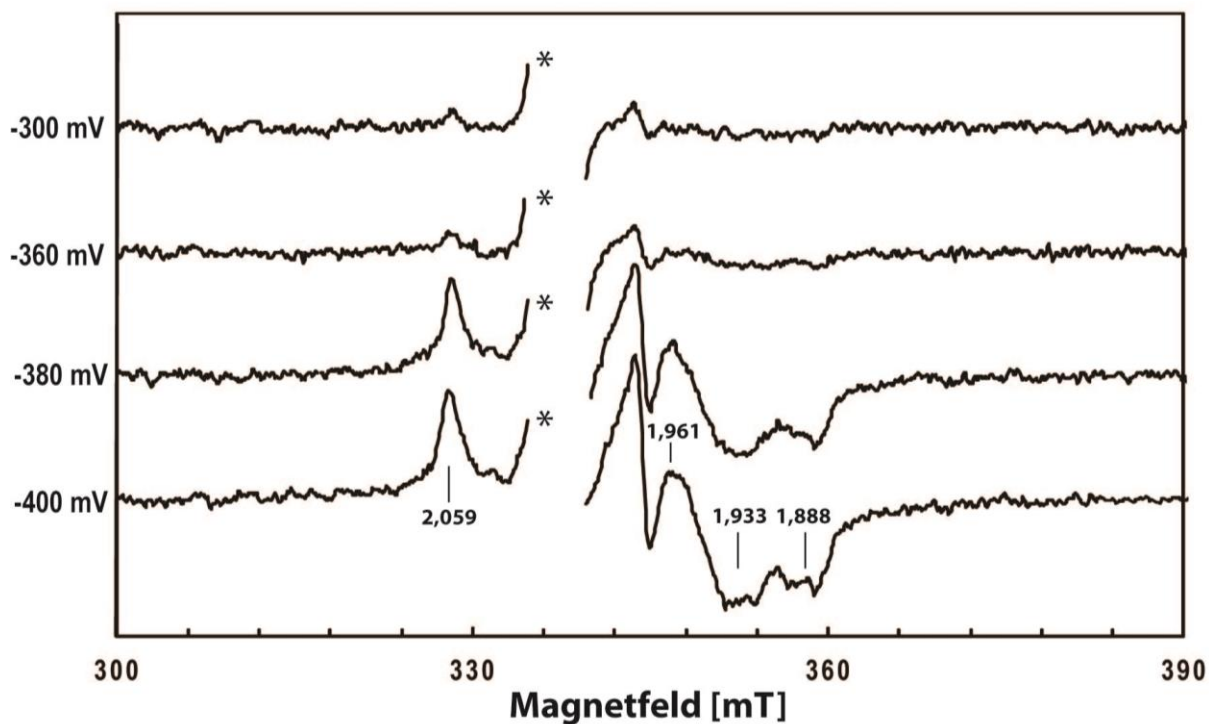


Abbildung 16: Redoxverhalten des gereinigten FrhABG Komplexes, verfolgt mittels ESR-Spektroskopie. Unter anaeroben Bedingungen wurde 2 ml einer 40 μ M FrhABG Lösung (in 50 mM Tris/HCl pH 7,6) sukzessive mit Na-Dithionit reduziert. Die ESR-Spektren, jeweils die Summe aus zwei Spektren, wurden unter folgenden Bedingungen aufgenommen: Temperatur von 11 K, Mikrowellenleistung von 2 mW, einer Modulations-Amplitude von 1,25 mT, einer Modulationsfrequenz von 100 kHz und eine Frequenz von 9,460 GHz. * Radikalspezies ($g = 2,004$), welche wahrscheinlich die radikalische Form von MV oder BV darstellt, wurde aufgrund der Übersichtlichkeit entfernt wurde.

3.2 Einzelpartikel Cryo-EM Struktur von FrhABG

Cryo-Elektronenmikroskopie (Cryo-EM) hat sich zu einer vielversprechenden Methode entwickelt, die es ermöglicht, die Architektur von großen Biomolekülen zu lösen. So ist es in dieser Arbeit gelungen, das Kohlenstoffrückrad des 1250 kDa FrhABG Komplexes von *M. marburgensis* in die Elektronendichte anzupassen, die mit Cryo-EM gewonnen werden konnte. Der FrhABG Komplex besteht aus 12 Kopien des Heterotrimeres FrhABG und bildet eine sphärische Proteinhülle mit einem leeren Innenraum. Die Cryo-EM Elektronendichte mit einer Auflösung von ~ 4 Å zeigt eindeutig die Elektronendichte des [NiFe]-Zentrums und der [4Fe4S]-Cluster. Die Struktur des gesamten Kohlenstoffrückrads konnte modelliert werden, wobei auch die Lokalisation des gebundenen Cofaktors FAD gezeigt wurde. FrhA und der N-terminale Teil von FrhG sind homolog zu bereits bekannten [NiFe]-Hydrogenasen, aber der C-terminale Teil von FrhG weist eine Ferredoxin-Faltung auf, welche einzigartig für FrhABG ist. Die Struktur von FrhB wurde anhand der Cryo-EM Dichte *de novo* modelliert. FrhB zeigt eine neue, noch nicht beschriebene Faltung mit einem [4Fe4S]-Cluster, FAD und der F₄₂₀-Bindestelle. Die potentielle Elektronendichte des F₄₂₀ liegt in direkter Nachbarschaft zum FAD und wurde ausschließlich in der Elektronendichte von FrhABG mit zusätzlich gebundenem F₄₂₀ gezeigt. Neben der Cryo-EM Struktur war es ebenfalls möglich, die Kristallstruktur des FrhABG Komplexes zu lösen (Abschnitt 3.3).

3.2.1 FrhABG Komplex

Durch Einzelpartikel Cryo-EM wurde eine 3D-Rekonstruktion des FrhABG Komplexes generiert (Abbildung 17, Abbildung 18). Dabei wurden in einer Strukturverfeinerung 84.000 Partikel berücksichtigt. Bei der Auswertung der Auflösungsgrenze der Elektronendichtekarte wird in der Cryo-EM der Fourier Shell Korrelationsplot angewendet, der die Auflösungsgrenze mit einem kritischen Wert (0,5) beschreibt. Demnach beträgt die Auflösung von FrhABG ~ 4 Å (bei 0,5) (Abbildung 17 D). Diese Auflösung wurde zum einen wegen der Homogenität der Proteinlösung erzielt (Abschnitt 3.1) und zum anderen, weil es im FrhABG Komplex keine bevorzugte Orientierung gibt. Dies geht durch die graphische Darstellung der Euler-Winkel hervor (Abbildung 17 C). Jeder Zylinder spiegelt einen asymmetrischen Winkel (1/12 des Tetrahedrons) wieder. Die Höhe der Zylinder ist proportional zu der Anzahl der Partikel, die diese Orientierung aufweisen und eine gleichmäßige Verteilung zeigen.

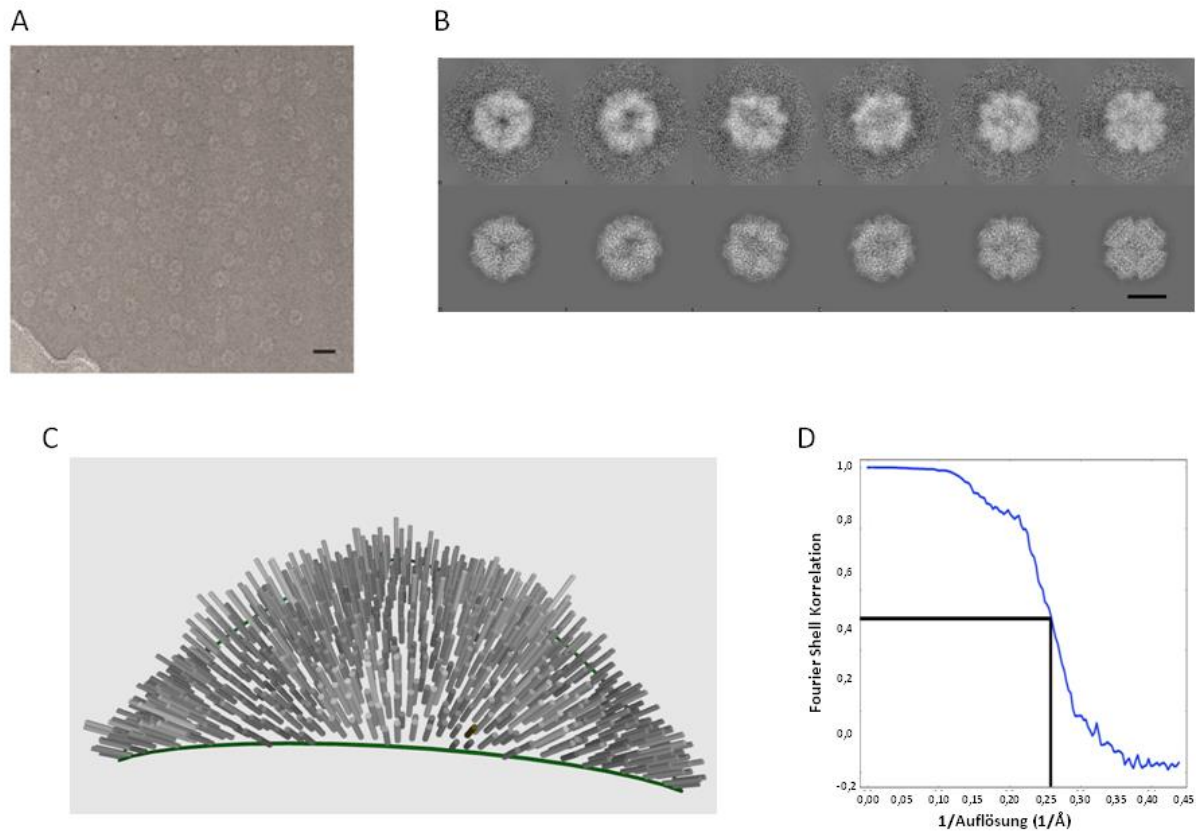


Abbildung 17: Cryo-EM, Bildbearbeitung und Auflösungsbestimmung. A: Repräsentative Cryo-EM Aufnahme, gemessen bei 200 kV an einem FEI Polara, der Fokus wurde bei 2,05 μm eingestellt. Die Maßstabskala beträgt 25 nm. B: Repräsentativer Gruppendurchschnitt und dazugehörige Reprojektion der FrhABG 3D-Rekonstruktion für die endgültige Verfeinerung. Die Maßstabskala beträgt 10 nm. C: Euler-Winkel für die endgültige Rekonstruktion. Die Verteilung zeigt, dass es im FrhABG Komplex keine bevorzugte Orientierung gibt. D: Fourier Shell Korrelationsplot. Für die Bestimmung der Auflösungsgrenze wurden 84.000 Partikel einbezogen. Bei einem Wert von 0,5 beträgt die Auflösung ~ 4 Å (schwarz).

FrhABG bildet einen sehr großen Komplex mit einem Molekulargewicht von 1,2 MDa (Abbildung 17 A). Der Durchmesser liegt bei ~ 16 nm und der Komplex besteht aus sechs Dimeren, die von je zwei FrhABG Heterotrimeren gebildet werden. Die drei Untereinheiten eines Heterotrimers weisen großflächige Kontaktstellen untereinander auf. Diese Dimere sind an der Oberfläche in einer tetrahedralen Symmetrie angeordnet und im Inneren des Komplexes liegt ein hohler Kern vor. Eine frühere EM Arbeit beschrieb hingegen eine zylindrische Anordnung der Untereinheiten (Braks et al. 1994).

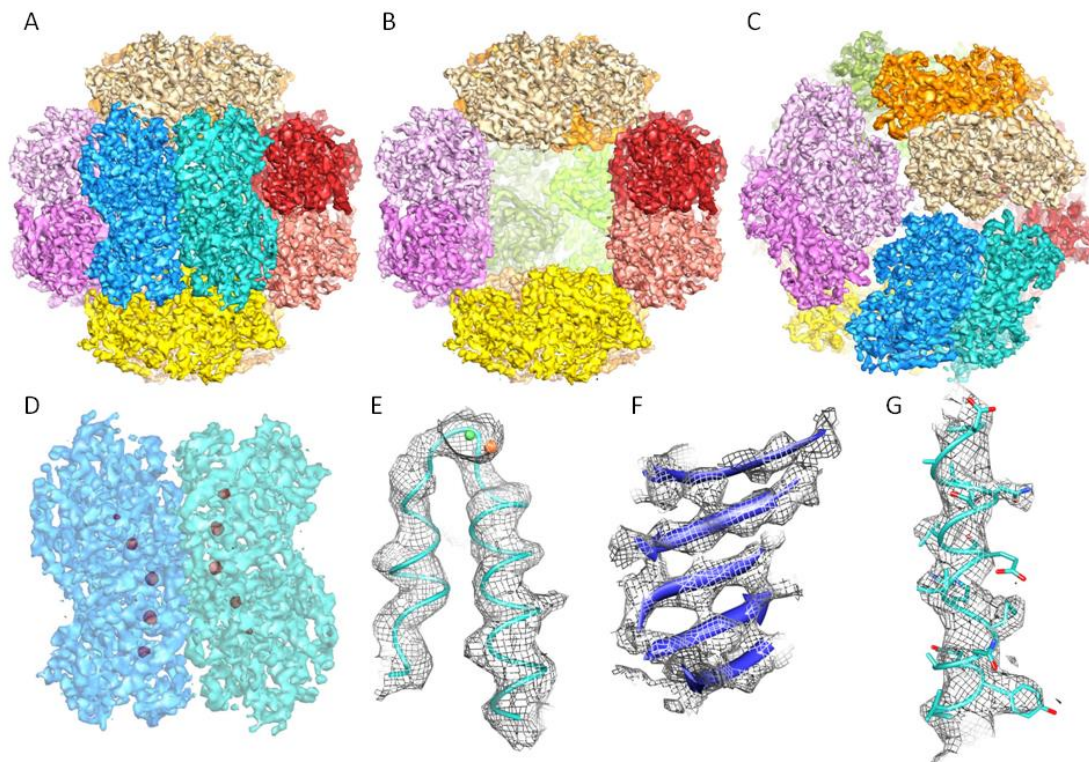


Abbildung 18: Hochaufgelöste Cryo-EM Elektronendichte von FrhABG. A: Blick auf die zweifach Achse. Jedes der 12 Heterotrimere ist in einer anderen Farbe dargestellt. B: Dieselbe Blickrichtung wie bei A, jedoch wurden zwei Trimere im Vordergrund entfernt. C: Blick auf die dreifach Achse. D: Nähere Betrachtung des vorderen Dimers aus A, dargestellt mit einer transparenten Oberfläche und einer hohen Dichte der Metallzentren, gezeigt in rot. Details der α -Kohlenstoffkette gezeigt mit Elektronendichte: E: Hairpin-Helix in FrhA. Das [NiFe]-Zentrum (grün/orange) wurde in Kugeln dargestellt; F: β -Faltblatt in FrhB; G: α -Helix in FrhA, gezeigt mit Seitenketten.

Die Elektronendichtekarte zeigt sechs eigenständige Dimere, die klar voneinander getrennt sind (Abbildung 18 A-C). Jedes Monomer weist eine Serie von fünf Elementen mit hoher Elektronendichte auf, die eine gekrümmte Bahn im Inneren des Proteins beschreiben und ~ 10 Å voneinander getrennt liegen (Abbildung 18 D). Diese Elemente können leicht als die vier FeS-Cluster und das [NiFe]-Zentrum interpretiert werden, wobei die kleinere Dichte dem [NiFe]-Zentrum zugeordnet wurde. Die FeS-Cluster wurden mittels ESR-Spektroskopie als [4Fe4S]-Cluster identifiziert (diese Arbeit, Alex et al. 1990a). Sequenzanalysen zeigten des Weiteren eine Ferredoxin-ähnliche Domäne, in die das mediale und distale Cluster gebettet wurden. Durch vier konservierte Cysteine in FrhB kann dort ebenfalls angenommen werden, dass es sich um ein [4Fe4S]-Cluster handelt (Alex et al. 1990a). Die beiden Elektronentransferketten in einem Dimer liegen mit einem Abstand von 17 Å nebeneinander. Dieser Abstand lässt keinen Elektronentransfer von der einen zu der anderen Kette zu (Page et al. 1999). Durch die Dichte der Cofaktoren, die am Elektronentransfer beteiligt sind, konnte die Lokalisation eines FrhABG Heterotrimers eindeutig zugeschrieben werden.

143	AGVDQYIEALEVRRICHEMVALFGGRMPHVQGVGGATEIPTKEKLVEY	192
122	LMADAINSVSEIRKNAQYVDMVAGEGIHPSDVRIGGMADNITELARKRI	171
	-----h--hR--hQ--h---hsGEGIH-----hGGMh--hz-----	
193	AARFKKVRDFVEQKYVPVYTIGSKYKDMFKVGGFKAALCVGAFFLDNS	242
172	YARLKQLKPKVNEHVELMIGLIEDKGLPEGLGVHNOPTLASHQIY----	216
	-----hE-h--h-----LGh-----hAz---Y	
243	GKKHLFMPGVYAKGKDMFPDPSKIKSYVKYSWFAEETTGLNYKEGKTIPA	292
217	-----GDRTKFDLDRFTIMPESWYDD-----	238
	G-----l--h-----hY--	
293	PKAGAYSFVKAPRYDGLSLEVGPLARMWVNNPELSPVGKKLLKDLFGIS	341
239	-PEIAKRACSTIPLYDGRNVEVGPARMVEFQGFKERG-----	275
	-----hP-l-G--hE-GPRARh--F--F---G	
342	AKKFRDLGEEAFAFLMGRHVARAEETYYMLGAIEGWLKEIKAGEDTVVMP	392
276	-----VVAQHVARALEMKTALSRAIEILDDELDTSAPVRADF	311
	-----hsR--E---h--hh-hh--h-----	
393	AVPAS-AEGTGFTAPRGSLHYVKVDSKIDNYQIVSASLWNCNPRDDM	433
312	DERGTGKLIGATEAPRGLDVHMAKVENGKIQFYSALVPTTWN-----	354
	-----hGhsh-Es-RG---H-A-h-----a-hhh-TTWN	
434	GQRGAVEEALIGIPVDDIQNPNVARLIRAFDPLGCAV	482
355	--IPTMGPALEGFH-----HEYGPHVIRAYDPLSCAT	386
	hP-----A-------ls--hhRAYDPChsCAz	

Abbildung 20: Sequenzvergleich von FrhA mit der [NiFe]-Hydrogenase von *D. vulgaris* Hildenborough.

Die mittlere Reihe zeigt die identischen (|) und ähnlichen (:) Aminosäuren. Der Sequenzvergleich erfolgte mit EMBOSS needle (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/). Die vierte Reihe zeigt die Konsensus-Sequenz von 19 FrhA Untereinheiten. Identische Aminosäuren sind in Großbuchstaben, ähnliche in Kleinbuchstaben, jedoch spiegeln hier die Buchstaben die Charakteristika der Seitenketten wieder: h=hydrophob; s=kleine Aminosäuren wie G,A,S; l=große Aminosäuren wie L,I,F,Y,H,W; a=aromatische Aminosäuren wie F,Y,W,H; z=T oder S, n=negative Aminosäuren wie D, E; p=positive Aminosäuren wie R, K. Strukturelle Charakterisierungen wurden manuell in den Strukturvergleich eingefügt. α -Helices sind in grün und β -Faltblätter in blau dargestellt. Aminosäuren, die in der Nähe des [NiFe]-Zentrums liegen, wurden in gelb und die Reste, die neben dem zusätzlichen Metall, in rot dargestellt, liegen.

Es gibt eine gute Übereinstimmung für die Lokalisation der charakteristischen α -Helices, das [NiFe]-Zentrum und für weitere Strukturelemente, wie z.B. zwei 3-strängige antiparallele β -Faltblätter, wenn bereits bekannte Strukturen der großen Untereinheit aus der Gruppe 1 [NiFe]-Hydrogenasen auf die neu generierte Elektronendichte von FrhA gelegt werden. Da die große Untereinheit der Gruppe 1 um 15 kDa größer als die von FrhABG ist, fehlen bei FrhA vor allem an der Peripherie einige Strukturelemente. Ein Strukturmodell für FrhA wurde anhand des bekannten Modells der Standardhydrogenase aus *D. vulgaris* Hildenborough (Abbildung 21) gebaut. Bis auf die ersten drei, konnten alle Aminosäuren für das FrhA Modell verwendet werden.

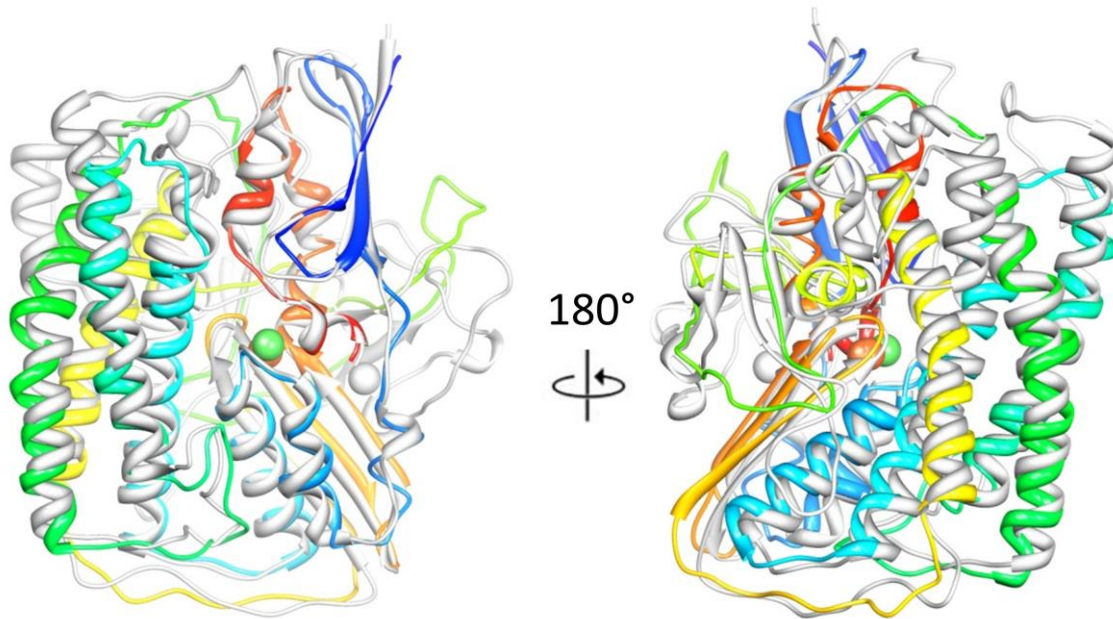


Abbildung 21: Struktureller Vergleich von FrhA mit der großen Untereinheit der [NiFe]-Hydrogenase von *D. vulgaris* Hildenborough. FrhA (Regenbogenfarben von blau zu rot) und die große Untereinheit der [NiFe]-Hydrogenase von *D. vulgaris* Hildenborough (grau; PDB-Code: 2wpn), sind in zwei unterschiedlichen Orientierungen (links und rechts) dargestellt. Das [NiFe]-Zentrum (grün/orange Kugeln) und das zusätzliche Metall (graue Kugel) überlappen, wie auch weitere Strukturelemente in der Umgebung und zwei drei-strängigen β -Faltblätter und vier Helix-Bündel.

Das [NiFe]-Zentrum ist von den Cysteinen Cys63, Cys66, Cys380 und Cys383 umgeben, welche in allen [NiFe]-Hydrogenasen konserviert vorliegen und dort das [NiFe]-Zentrum koordinieren. Die Gruppe 1 [NiFe]-Hydrogenasen enthalten in der großen Untereinheit neben den Metallen des aktiven Zentrums ein weiteres, typischerweise Mg^{2+} oder $Fe^{2+/3+}$ (Higuchi et al. 1997; Garcin et al. 1999). In der FrhABG Elektronendichte wurde an dieser Position auch eine Differenzdichte für ein Metall detektiert (Abbildung 22). Die Reste Glu44, Glu229 und His386, die in bekannten Strukturen das Metall koordinieren, liegen ebenfalls in FrhA konserviert vor (Abbildung 20). Nach His386 wurde in FrhA keine weitere Elektronendichte generiert, auch gibt es in der Struktur keinen freien Raum, um die fehlenden 19 Aminosäuren zu modellieren. Aus bereits bekannten Strukturen von [NiFe]-Hydrogenasen ist bekannt, dass das C-terminale Ende nach diesem Histidin enzymatisch während der Generierung des [NiFe]-Zentrums entfernt wird (Menon et al. 1993; Theodoratou et al. 2005); möglicherweise durch *frhD* (Thauer et al. 2010; Liesegang et al. 2010).

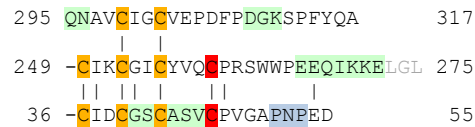


Abbildung 23: Sequenzvergleich von FrhG mit der kleinen Untereinheit der Standard [NiFe]-Hydrogenase von *D. vulgaris* Hildenborough und dem Ferredoxin von *P. asaccharolyticus*. Die mittlere Reihe zeigt die identischen (|) und ähnlichen (:) Aminosäuren. Der Sequenzvergleich erfolgte mit ClustalW. α -Helices sind grün, β -Faltblätter blau dargestellt. Die Liganden bzw. bei FrhABG die Reste in der Nähe des proximalen [4Fe4S]-Clusters wurden in gelb, die des Medialen in orange und des distalen Clusters in rot dargestellt. Aminosäuren die in der FrhABG Struktur nicht sichtbar sind, sind grau. Die ersten 38 Aminosäuren von FrhG scheinen nicht zum Protein zu gehören und sind in hellgrau dargestellt.

Die N-terminale Domäne enthält drei parallele β -Faltblätter, die von kurzen α -Helices flankiert werden (Abbildung 24). In der Gruppe 1 [NiFe]-Hydrogenasen ist das proximale FeS-Cluster im C-terminalen Ende der β -Faltblätter lokalisiert und wird in der Regel durch vier Cysteine koordiniert. In der Primärstruktur von FrhG ist eins dieser konservierten Cysteine durch Aspartat ersetzt (Abbildung 23). Aus diesem Grund wurde dieses Asp60 in der Nähe des proximalen Clusters modelliert (Abbildung 24). Aspartat wurde schon in der Vergangenheit als ein Ligand für [4Fe4S]-Cluster in Ferredoxin von *Pyrococcus furiosus* (Calzolari et al. 1995) und *Thermococcus profundus* (Imai et al. 2001), in der lichtunabhängigen Protochlorophyllid-Reduktase BchN-BchB (PDB-Code: 3aeu; (Muraki et al. 2010)) und dem Transkriptionsregulator Fnr von *Bacillus subtilis* (Gruner et al. 2011) beschrieben.

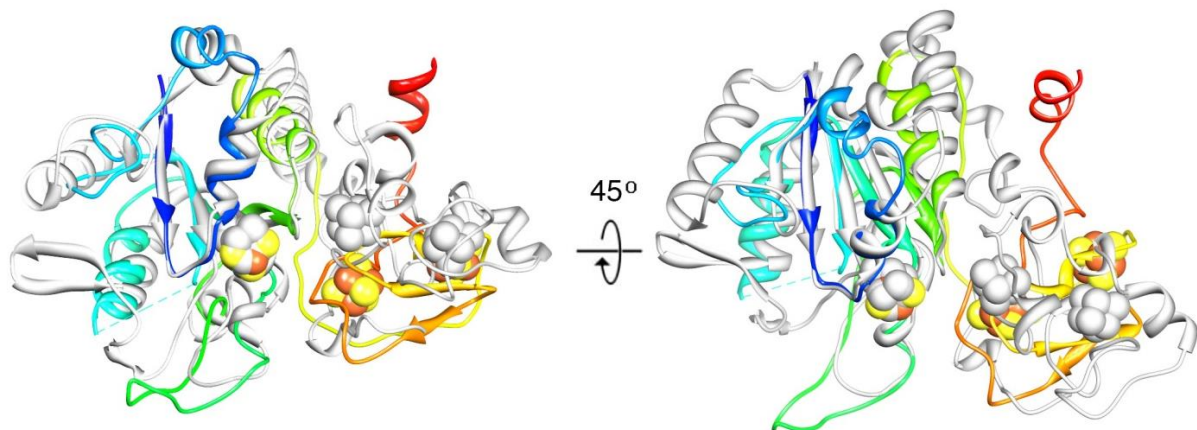


Abbildung 24: Struktureller Vergleich von FrhG und der kleinen Untereinheit der [NiFe]-Hydrogenase von *D. vulgaris* Hildenborough. FrhG (Regenbogenfarben von blau zu rot) und die kleinen Untereinheit der [NiFe]-Hydrogenase von *D. vulgaris* Hildenborough (Grau; PDB-Code: 2wpn), sind in zwei unterschiedlichen Orientierungen (links und rechts) dargestellt. Die Struktur in der Nähe des proximalen [4Fe4S]-Clusters (blau-grün) ist konserviert, aber der restliche Teil variiert. Die Ferredoxin-ähnliche Domäne (gelb zu rot) beinhaltet das mediale und distale FeS-Cluster und ist nicht homolog bzw. überlappt nicht. FeS-Cluster sind als Kugeln dargestellt, wobei diejenigen von FrhG übersichtshalber in orange/gelb gefärbt wurden.

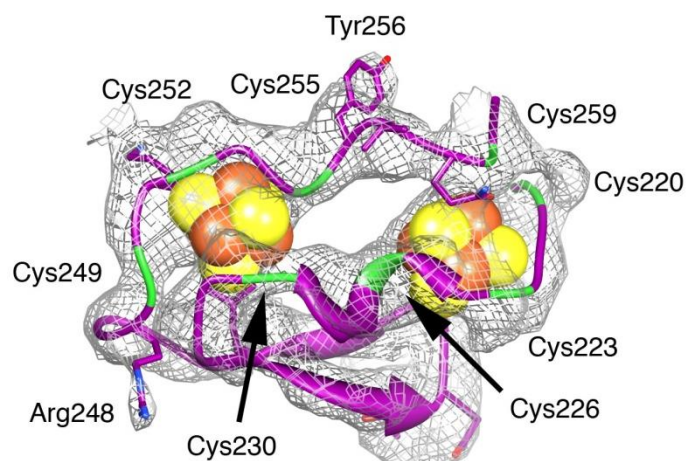


Abbildung 25: Die Ferredoxin-ähnliche Domäne von FrhG. Die acht Cysteine, welche die beiden [4Fe4S]-Cluster (orange/gelb) umgeben, sind in grün dargestellt.

Die C-terminale Domäne von FrhG weist keine Ähnlichkeit zu Gruppe 1 [NiFe]-Hydrogenasen auf. Stattdessen zeigt die Sequenz eine Ferredoxin-ähnliche Domäne mit zwei CxxCxxCxxxC Sequenzmotiven, die zwei [4Fe4S]-Cluster binden können (Abbildung 23). Mit diesem Wissen wurde die C-terminale Domäne von FrhG mit Hilfe von Ferredoxin modelliert (Abbildung 23, Abbildung 25). Im Gegenteil zu FrhA, dessen Modell vollständig gebaut wurde, konnte in FrhG ein Bereich aus 12 Aminosäuren in der Nähe der Oberfläche nicht modelliert werden (Abbildung 23). Eine Modellierung des Kohlenstoffrückrades war dort aufgrund fehlender Elektronendichte nicht möglich. FrhG von *M. marburgensis* wurde mit einer Länge von 275 Aminosäuren annotiert (Liesegang et al. 2010). Es wurde jedoch keine Elektronendichte für 45 N-terminale Aminosäuren dargestellt. Das bedeutet, dass *frhG* mit großer Wahrscheinlichkeit mit dem Startcodon GTG startet, welches im Genom jedoch als Val39 annotiert wurde (Fox et al. 1987; Alex et al. 1990b). So fehlt für FrhG wahrscheinlich nur die Elektronendichte für die ersten sieben Aminosäuren.

3.2.4 FrhB

FrhB enthält ein [4Fe4S]-Cluster, ein FAD und die F₄₂₀-Bindestelle. Es gibt keine bekannte homologe Struktur für diese Untereinheit. Die Struktur von FrhB wurde deshalb *de novo* gelöst. Sekundärstrukturvorhersagen (Abbildung 26) und besondere Eigenschaften der Elektronendichtekarte, welche acht Helices, elf β -Faltblätter und das FeS-Cluster beinhalten, dienten als Hilfe für die Interpretation der Elektronendichtekarte, die letztlich zur Strukturlösung führten.

```

1  MVLGTYKEIV SARSTDREIQ KLAQDGGIVT GLLAYALDEG IIEGAVVAGP GEEFWKPQPM
   ..hG.Y..hh sARs....h. ..sQDGGhhz ...hYsln.. hhnsshhh.. ....a.....

61  VAMSSDELKA AAGKYTFSP NVMLKKAVR QYGIEKLGTV AIPQCQTMGIR KMQTYPFQVR
   hhhhhhEh.. s.GzKYz..SP Nh..hK.AhR .aGhn.hshh s..Q...shR K...YP...R

121 FLADKIKLLV GIYCMENFPY TSLQTFICEK LGVSMELVEK MDIGKGKFWV YTQDDVLTLP
   .h..KI.hhh GIaCMENF.. .....K ..TGKGKF.. .....h.

```



```

181 LKETHGYEQA GCKICKDYVA ELADVSTGSV GSPDGWSTVI TRTDAGDSIF KQAVEAGLFE
    L..TH.YEQ. sC...DThs .LsDhzzGSV GSPDGWSThh .Rz..G..ll .....lE

241 TKPIEEVKPG LGLLEKLAAQ KKEKAENIA ARKEMGLPTP F
    .....hKPG L.Lh.KLA.. K.....K.h. ....hG.... .

```

Abbildung 26: Die Sequenz und Sekundärstrukturvorhersagen von FrhB. Hellgrau: keine Dichte; grüne Unterlegung: α -Helix; blaue Unterlegung: β -Faltblatt. Zweite Reihe: Konsensussequenz von FrhB Arten. Identische Aminosäuren sind in Großbuchstaben, ähnliche in Kleinbuchstaben, jedoch spiegeln hier die Buchstaben die Charakteristika der Seitenketten wieder: h=hydrophob; s=kleine Aminosäuren wie G, A, S; l=große Aminosäuren wie L, I, F, Y, H, W; a=aromatische Aminosäuren wie F, Y, W, H; z=T oder S, n=negative Aminosäuren wie D, E; p=positive Aminosäuren wie R, K. Strukturelle Charakterisierungen wurden manuell in das Alignment eingefügt. In der Konsensussequenz sind die Aminosäuren die in der Nähe des FeS-Clusters und der potentiellen Elektronendichten für FAD bzw. F₄₂₀ modelliert wurden in orange, türkis bzw. gelb unterlegt.

Die charakteristischste Eigenschaft von FrhB ist eine ~ 35 Å Helix an der Oberfläche des Komplexes. Diese Helix besteht aus 24 Aminosäureresten und wurde als C-terminale Helix vorhergesagt. Das FeS-Cluster wird möglicherweise durch vier hoch konservierte Cysteine koordiniert (Cys104, Cys134, Cys192 und Cys195; Abbildung 29), die in dem Cryo-EM Modell in die Nähe des [4Fe4S]-Clusters modelliert wurden. Der Hauptteil von FrhB besteht aus sechs starren β -Faltblättern. Elektronendichte die ~ 8 Å vom FeS-Cluster entfernt liegt, wurde als Isoalloxazinring von FAD interpretiert. Der Pyrophosphatteil liegt demnach in nächster Nähe zum N-terminalen Ende einer α -Helix. Dies ist ein gängiges FAD-Bindemotiv, denn durch den Dipol der Helix kann die negative Ladung des Pyrophosphates kompensiert werden ((Dym und Eisenberg 2001); Abbildung 28). So wie das FAD in die Elektronendichte modelliert wurde, zeigt es eine gekrümmte Konfirmation, in der sich das Adenin nur ~ 4 -5 Å von dem Isoalloxazinring entfernt in der Nähe eines Loops befindet (Abbildung 28 A). Dabei wird das FAD von einer hochkonservierten Proteinregion umschlossen (Abbildung 26).

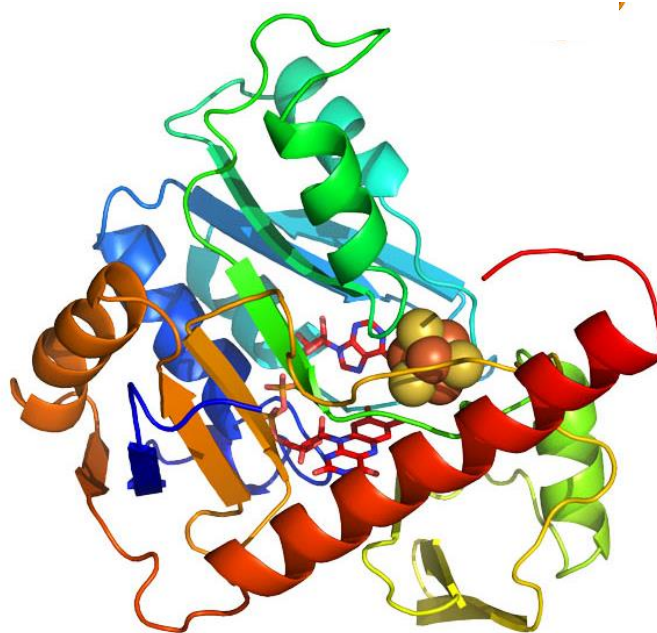


Abbildung 27: Struktur von FrhB. Die FrhB Struktur ist in Regenbogenfarben von blau zu rot dargestellt. Das FeS-Cluster ist in orange/gelben Kugeln und Ferredoxin in rot/blau dargestellt.

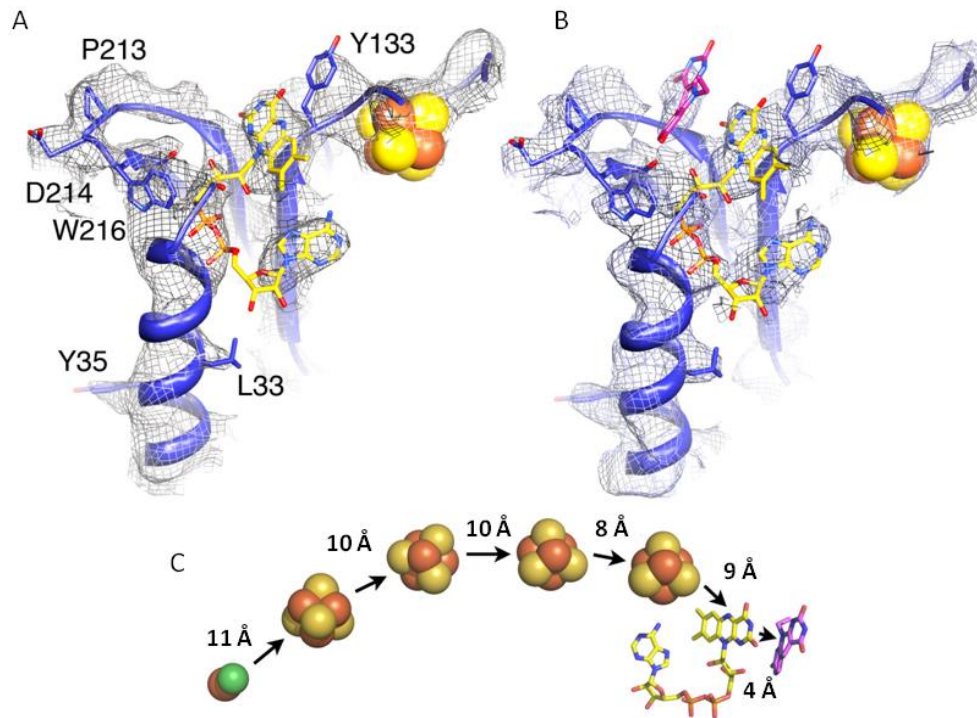


Abbildung 28: F₄₂₀-Bindung und Elektronentransferkette in FrhABG. Elektronendichtekarte in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) des Substrats F₄₂₀. Gezeigt ist ein konservierter Loop, zwischen zwei β -Strängen, in der Nähe vom FAD (Kohlenstoffe in gelb). Der Isoalloxazinring von F₄₂₀ (Kohlenstoffe in pink) wurde in die Elektronendichte eingefügt. C: Elektronentransferkette mit angegebenen Abständen der benachbarten Cofaktoren. Das [NiFe]-Zentrum (grün/orange) und die [4Fe4S]-Cluster (orange/gelb) wurden in Kugeln dargestellt.

Für die Identifizierung der Substratbindestelle wurden Cryo-EM Aufnahmen des FrhABG Komplexes in Anwesenheit einer hohen Konzentration des Coenzym F₄₂₀ aufgenommen. Die daraus kalkulierte Elektronendichte wurde zu einer ähnlichen Auflösung verfeinert, wie der Komplex ohne zusätzliches F₄₂₀. In allen Verfeinerungsstufen wurde eine zusätzliche Elektronendichte in einer Region beobachtet, die nicht ohne Zugabe von Substrat auftaucht (Abbildung 28 A, B). Die zusätzliche Dichte liegt in einem Abstand von ca. 4 Å zum Isoalloxazinring des FAD. Bei der Elektronendichte könnte es sich um die des Substrates F₄₂₀ handeln. Die beiden Cofaktoren sollten im van-der-Waals Kontakt zueinander stehen, um den Hydridtransfer zu gewährleisten (Abbildung 28 C). Die Elektronendichte des F₄₂₀ liegt annähernd parallel zu der von FAD. Das F₄₂₀ sitzt in einer großen Tasche, die von hochkonservierten Aminosäuren umgeben (Abbildung 26) und leicht von der Oberfläche her des Komplexes zugänglich ist. Die Elektronendichte des F₄₂₀ ist in einem Loop zwischen zwei β -Faltblättern, an der Oberfläche des Komplexes lokalisiert. Interessanterweise liegen sowohl die Aminosäuren, die möglicherweise das FeS-Cluster und das FAD koordinieren, aber auch das F₄₂₀ in der FrhB-Familie (Johnson und Mukhopadhyay 2005) konserviert vor (Abbildung 29). Manche dieser Proteine haben eine N-terminale Ferredoxin-ähnliche Domäne (die bei FrhABG Teil von FrhG ist) und viele haben eine C-terminale Domäne mit der Bindestelle für das Substrat. Sekundärstrukturvorhersagen sagen für alle Enzyme die gleiche Faltung wie für FrhB vorher. Die Faltung von FrhB hat keine Homologie zu bereits bekannten Strukturen von F₄₂₀-bindenden Enzymen, welche alle kein FAD, sondern Methyl-H₄MPT⁺ oder NADP (Ceh et al. 2009) als Coenzyme enthalten.

Cons	-----l-clhhAps-----sQDGGghzsl1-Yhlcc--hnshhhh-----acs--hhh--s-h	
FrhB	1 MVLGTYKEIVSARS TDREIQKLAQDGGIVTGLLAYALDEGIIEGAVVAGPG-EEFWKPQPMVAMSSDEL	62
GS	268 -EPLGEYTEILSARA----PMFRGQDGGVVTALLTYALREGIVDGALVVD RDPAMPWKPVVLAEDPEDV	332
FqoF	114 -NGLGEYIEVVAARSKR---FVGQDGMVTEFTASALEMGIIERAIFVARD--SNWRTRVVTIKTPEQL	177
FpoF	74 -NELANVRKFFAARS---KENAGSQDGGVTSGLKSLFKQKIDCAVGITR--DEKWEKSVVLLTSAEDV	137
Fsr	66 -IREKFYEKYIYAKS-----DIEGQDGGVVTAFLLKYLLENGKIDGAIVVG--DECWKPVSLVVQNAEDL	126
FdhB	1 MKYLLARATDEEIQRKGECCGAVTAIFKYMLDKEVVDVAVLTLERG-YDVYDGI PVLLLEDSSGI	62
Cons	--h--zKY--h--L-----phshhh-PQ--shp-hc-----	
FrhB	69 KAAAGTKYTFSPNVMLKKA VRQY GIEKLGTVAI PCQTMGIRKMQTYPFQVRF-----LADKIK	127
GS	333 VRAAGTKYSVCPILKVLKE351 1MSRYAMVGT PCQITATLMKEYN-----GEFPVE	29
FqoF	178 YDRKITGTYKSYADVLPALKEAVLKSEAVGVFGT PCMVSAVRKMQQAFKKFER-----VK	232
FpoF	138 EKVRGTYKTSDFVVAALREAFKEY--DRIAVGVG PCQAH SARLIREN-----VSEKIV	188
Fsr	127 LKTAKSKYAIST-LDALRKAGEMG-LEKVAVVGL PCQINGLRKLQYFPYHAKHDLELGRNGKPVKLPKIE	194
FdhB	63 ESTCGSLHCAPT MFGDLISRYLSD--MRLAVAVKPCDAMAI RELEKRHQ-----IDPDKV	115
Cons	h-hGllC--l-----l-----h-hc-V--c1-pGp1lh-h-n-----h-lc----	
FrhB	128 LLVGIYCMENFPY-TSLQTFICEKLGVSMELV EKMDIGKGFVWYTD-DVLTLP LKETHG---YEQAGC	192
GS	30 LRIGLFCMENFSY-TYLR EL-AEAEVDLRDVSECRIEKGR LWFH LNDGSTVSIPLERARS---AMRKNC	94
FqoF	233 LAIGLFC TENFYH-HDLYKFLLEKANADLRNAVKT DIKKGKFIVEMKDGSKVRIPVKDFEE---IIPSGC	295
FpoF	189 LIIGLLCMESFHHDVMDKIIPEIMKV KIEDVRKMEFTKGKFWVYTS DGEVHSVP IKDVAK---YARNPC	255
Fsr	195 YLIGLFC TEKFRYDNMKVELS--KHGIDIEKVEKFDIKKGKLLVYVN-GEKKEFDLKEFEI-----CSGC	256
FdhB	116 YKIGLNCGGT LAPVSAREMIETF-YEIDPD DVVSEIDRGKFIVELRDGS HREISIDYLEEGFGGRENC	184
Cons	--C--1-s--sDhshG-hGs-DGaz-h--pTn-Gp-l-c-h-----hcKh-----	
FrhB	193 KICKDYVAELADVSTG SVSGSPDGWSTVITRTDAGSDIFKQAVEAGLFETKPIEEVKPGLGLEKLAQKK	262
GS	95 SVCMDFTSEQSDVSVG SVSGSPQGWSTLIIRTERGRELV DGAAGAGYIETAPITGK--GLKLEKLAGSKK	162
FqoF	296 KVCQDFAAVE SDVSVG SVSGSPNRFSTVMVRTEVAKQILDYIREKDYAEFG-----EAKLDIVQKLC DHKM	363
FpoF	256 HHCCDYTSVFADISVGS VSGPDGWSVFI RTDAGEEYFEMVREE---MEIMEDPKPGLELVKKLIDMKR	321
Fsr	257 KMC RDFDAEMADVSVG SVSGSPDGYSTIIIRTEKGE EIKNAVELK-----EGVNLEEIEKLRQLKL	316
FdhB	185 QRCEIMVPRNADLACGNW GADGWTFIEVNTERGQBIIEGARSSGYIE-----AREPSEKMKVIREKIE	248
Cons	-----	
FrhB	263 EKAENIAARKEMGLPTPF	281
GS	163 EENLEEIQRR ESVARPVLYWRVMPGDLYPEEIKDCQFDDLRADVIDVGACVLCGACEASCEGIVRIND-	231
FqoF	364 KIHWP PPKKEEKSEE	379
FpoF	322 KNNAEHFKEVCKEFSFETGIRDET V	346
Fsr	317 KRFKKEVERRRENNEYVSFYWTADYGGIGK RADGTYFIRVRAKPGGWYKPEEIKEILDIAEEYNAKIKV-	385
FdhB	249 NAMISMARKFQDKYLDEEYPSLDEWDEYWKRCINCFACRDACPVCF CRECELEKDYLLSEDEKAPDLT-	317

Abbildung 29: Sequenzvergleich der FrhB-Familie.

FrhB, FrhB von *M. marburgensis* DSM 2133; GS, die F₄₂₀-abhängige Glutamatsynthase von *M. marburgensis*, ADL58239; FqoF, die F₄₂₀H₂:Quinon-Oxidoreduktase Untereinheit F von *Archaeoglobus fulgidus* DSM 4304, NP_070660; FpoF, die F₄₂₀H₂:Phenazin-Oxidoreduktase Untereinheit F von *Methanoscarya barkeri* Stamm Fusaro, YP_303819; Fsr, die N-terminale Domäne von Fsr, der F₄₂₀-reduzierende Sulfid-Reduktase von *M. jannaschii* DSM 2661, Y870_METJA; FdhB, die β Untereinheit der Formiat-Dehydrogenase von *M. marburgensis*, YP_003850414. Cons: Konsensussequenz der FrhB-Familie. Identische Aminosäuren sind in Großbuchstaben, ähnliche in Kleinbuchstaben, jedoch spiegeln hier die Buchstaben die Charakteristika der Seitenketten wieder: h=hydrophob; s=kleine Aminosäuren wie G, A, S; l=große Aminosäuren wie L, I, F, Y, H, W; a=aromatische Aminosäuren wie F, Y, W, H; z=T oder S, n=negative Aminosäuren wie D, E; p=positive Aminosäuren wie R, K. In der Konsensussequenz sind die Aminosäuren die in der Nähe von dem [4Fe4S]-Cluster, dem FAD und dem F₄₂₀ liegen in orange, türkis bzw. gelb unterlegt. Sekundärstrukturvorhersagen für die Proteine erfolgte mit PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Grüne Unterlegung: α-Helix, graue Unterlegung: β-Faltblatt. Hochkonservierte Aminosäuren sind fett markiert. Die Aminosäurenummerierung ist in rot angegeben. Es sei hervorgehoben, dass die 83 Aminosäuren des C-terminalen Endes von GS mit dem N-Terminus von FrhB und die 182 Aminosäuren des N-Terminus von GS mit dem C-terminalen Ende von FrhB verglichen wurden.

3.3 Kristallstruktur von FrhABG

In diesem Abschnitt wird die 1,8 Å Kristallstruktur des FrhABG-Komplexes aus *M. marburgensis* vorgestellt. Diese Struktur von FrhABG stellt die erste Kristallstruktur einer F₄₂₀-reduzierenden und archaeellen [NiFe]-Hydrogenase der Gruppe 3 dar. Im Gegensatz zu anderen [NiFe]-Hydrogenasen bildet FrhABG einen makromolekularen Komplex aus 12 Heterotrimeren mit einer Gesamtmasse von 1250 kDa. Da die Auflösung eines zur Verfügung stehenden Cryo-EM Model von FrhABG nicht ausreichte, um die Bindung der Cofaktoren und den katalytischen Prozess auf atomarer Ebene zu verstehen, war eine hoch aufgelöste Röntgenkristallstruktur von Bedeutung. Bisher wurden nur wenige Strukturen solcher großen Komplexe mit einer derart hohen Auflösung beschrieben. FrhABG weist eine Reihe von vorher noch nie beschriebenen Merkmalen für [NiFe]-Hydrogenasen auf, die in den folgenden Kapiteln im Detail vorgestellt werden.

3.3.1 Strukturlösung des FrhABG Komplexes

Um brauchbare Kristalle zu züchten, die eine atomare Auflösung von FrhABG erlaubten, wurden über 1000 unterschiedliche Kristallisationsbedingungen getestet und diejenigen optimiert, die die besten Diffraktionsmuster aufwiesen. Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen des Fällungsmittels, der Salze und unterschiedliche pH-Werte getestet und das Kristallwachstum verfolgt. Weitere Kristallisationsversuche mit unterschiedlichen Additiven führten schließlich zu einer erfolgsversprechenden Bedingung mit dem Zusatz Trimethyl-N-Oxid. Beim Vermessen der Kristalle fiel auf, dass auch die Art des Einfrierens wesentlich die Qualität des Diffraktionsmusters bestimmte. Die besten Ergebnisse wurden durch ein extrem schnelles schockartiges Einfrieren im fließenden Stickstoffstrom erhalten. Die Kristalle wuchsen in der kubischen Raumgruppe F₂₃ mit den Einheitszellparameter 232,7 Å, 232,7 Å, 232,7 Å, 90,0°, 90,0° und 90,0° und streuten bis zu einer Auflösung von 1,8 Å (Tabelle 4, Abbildung 30). Daher war es wahrscheinlich, dass sich zwei FrhABG-Dodekamere in der Elementarzelle befinden und dass sich die kristallographische und biologische Symmetrie entsprechen. Demzufolge liegt in der asymmetrischen Einheit genau ein Heterotrimer. Die spätere Strukturlösung bestätigte diese Vermutungen.

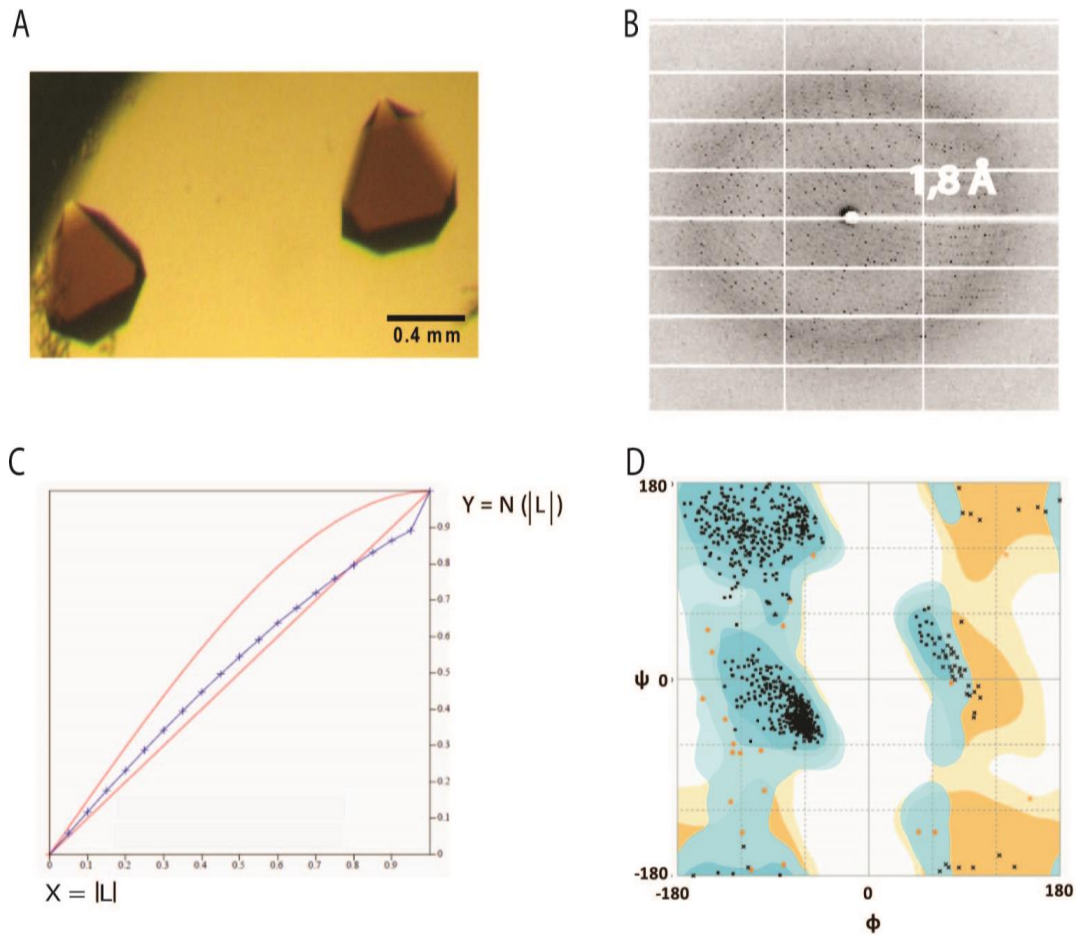


Abbildung 30: FrhABG Kristalle, Datensammlung, Zwillingsseigenschaft und Ramachandran Plot. A: Braune FrhABG Kristalle wuchsen in einer kubischen Form mit 17-20% PEE 797, 400 mM MgCl_2 , 100 mM Trimethylamine N-Oxide, 5% Glycerin, und 100 mM MES pH 6,5. Die maximale Kristallgröße betrug $0,4 \times 0,4 \times 0,4 \text{ mm}^3$. B: Diffraktionsmuster der FrhABG Kristalle; ihre Auflösungsgrenze liegt bei $1,8 \text{ \AA}$. C: Mit dem ausgewerteten Datensatz frh36.hkl wurde die Zwillingsseigenschaft des Kristalls, bestimmen. Aufgrund seiner geringen Verzwilligung (blaue Kurve) wurde dieser Kristall für die Strukturlösung verwendet. Die roten Kurven geben dabei den Wert einer perfekten Zwillingsseigenschaft (obere Kurve) und den Wert ohne diese (untere Kurve) an. D: Ramachandran-Plot des verfeinerten FrhABG-Modells zeigt, dass die dihedralen Winkel ϕ, ψ der Polypeptidkette in erlaubten Bereichen liegen (blau: günstige dihedrale Winkeln; orange: erlaubte dihedrale Winkel; weiß: nicht erlaubte dihedrale Winkel; Punkte: Aminosäurereste).

Es war jedoch unmöglich, röntgentaugliche Kristalle zu produzieren, die nicht verzwilligt waren (Abbildung 30). Allerdings unterschied sich der Zwillingsanteil der einzelnen Kristalle und es war möglich, die Struktur von einem Kristall mit einem Zwillingsanteil von etwa 75:25 zu lösen. Dieser konnte näherungsweise als ein Einkristall betrachtet werden (Abbildung 30 C). Ein weiteres Problem war, dass der Zwillingsanteil innerhalb eines Kristalls nicht homogen war. So war es nur möglich, relativ schlechte Phasen zu erhalten, da die an verschiedenen Stellen des Kristalls vermessenen „peak“, „inflection“ und „remote“ Datensätze nicht aufeinander skaliert werden konnten. Aufgrund des Strahlenschadens am Kristall mussten die Datensätze an verschiedenen Stellen durchgeführt werden. Daher wurde die experimentell erhaltenen und die aus dem Cryo-EM Modell (Abschnitt 3.2) berechneten Phasen kombiniert, wodurch die Qualität der Elektronendichte deutlich verbessert und ein Modell angepasst werden konnte.

Tabelle 4: Datensammlung von FrhABG. Native Datensätze von FrhABG unter reduzierten (mit 5% H₂) und oxidierten Bedingungen (mit Kaliumhexacyanoferrat) wurden mit dem anormalen Datensatz in einer Tabelle zusammengefasst.

Datensatz	Nativ (wie isoliert) (5% H ₂)	Peak (wie isoliert) (bei $\lambda=1,71$ Å)	Nativ (oxidiert)
Raumgruppe	F ₂₃	F ₂₃	F ₂₃
Zelldimension (Å, °)			
a=b=c	232,7 232,7, 232,7	233,2 233,2, 233,2	233,1, 233,1, 233,1
$\alpha=\beta=\gamma$	90,0, 90,0, 90,0	90,0, 90,0, 90,0	90,0, 90,0, 90,0
Vollständigkeit (%)	92,0 (75,1)	99,9 (97,6)	96,3 (95,5)
R_{sym} (%)	14,3 (107,6)	15,1 (6,3)	11,2 (8,4)
I/σ(I)	5,9 (0,9)	12,7 (33,4)	11,5 (21,4)
Verfeinerungsstatistik			
Anzahl der Reste, [NiFe], CO, CN ⁻ , [4Fe4S]-Cluster, FAD und Wassermoleküle	893, 1, 1 2, 4, 1, 747		893, 1, 1 1, 4, 1, 380
Auflösungsbereich (Å) (letzte Schale)	50,0–1,8	12,8–2,5	12,8–2,6
Anzahl der Reflexe ($F > 0\sigma$)	96498	32272	68341
R _{Arbeit} (%)	15,1		16,5
R _{frei} (%)	18,3		19,2
Rmsd für Bindungslänge (Å)	0,031		0,037
Rmsd für Bindungswinkel (°)	2,5		2,5
Temperaturfaktor (Å ²)	21,3		42,0
Polypeptide, Cofaktoren, Liganden, Wasser	3, [NiFe], [4Fe4S], FAD, CO, CN ⁻ , Mg, H ₂ O		3, [NiFe], [4Fe4S], FAD, CO, CN ⁻ , Mg, H ₂ O
Reste mit günstigen dihedralen Winkeln	869 (97,6%)		835 (93,8%)
Reste mit noch erlaubten dihedralen Winkeln	21 (2,4%)		51 (5,7%)
Reste mit in nicht erlaubten dihedralen Winkeln	0 (0,0%)		4 (0,4%)

Die Verfeinerung der Struktur Nativ (wie isoliert) führte zu einem finalen R_{Arbeit}-Faktor von 15,1% (Tabelle 4). Der freie R-Faktor, welcher vor einer Überanpassung des Modells warnt, weist mit 18,3% nur geringfügig vom ersten Wert ab. Pro Heterotrimer wurden neben 893 Resten von drei Polypeptidketten, ein [NiFe]-Zentrum, zwei CN⁻ bzw. ein CO, ein Magnesium, vier [4Fe4S]-Cluster und ein FAD, neben 747 Wassermolekülen in die Elektronendichte modelliert. Insgesamt liegen 97,6% der

dihedralen Winkel in energetisch günstigen Regionen, 2,4 % in noch erlaubten und keine Reste in nicht erlaubten Regionen vor (Abbildung 30 D).

3.3.2 FrhA

FrhA (1-386) entspricht der großen Untereinheit der [NiFe]-Hydrogenase, die das [NiFe]-Zentrum bindet. FrhA kann in vier Domänen unterteilt werden (Abbildung 31 A). Domäne 1 (1-39, 350-386) setzt sich aus einem N-terminalen dreisträngigem β -Faltblatt und zwei kurzen α -Helices zusammen und Domäne 2 (315-349, 40-83) genau umgekehrt aus einem C-terminalen Faltblatt und drei kurzen N-terminalen Helices. Domäne 3 (87-195, 275-307), bestehend aus einem Vier-Helix-Bündel, liegt in allen bekannten Strukturen konserviert vor. Domäne 4 (197-276) ist nach der dritten Helix (165-196) eingeschoben und an die Domänen 1 und 2 angelagert. Diese Domäne besteht aus einem kurzen zwei-strängigen β -Faltblatt, einigen kurzen Helices und überwiegend aus ungeordneten Bereichen. FrhA zeigt eine Standardabweichung der Atompositionen von 2,0 Å zu den nächst verwandten [NiFe]-Hydrogenasen von *D. gigas* (70%) und *D. vulgaris* (77%), wobei 70% bzw. 77% der C α -Atome zur Berechnung herangezogen wurden (Abbildung 31 A, Abbildung 32). Im Vergleich zur großen Untereinheit der bekannten Hydrogenasen ist FrhA um ca. 160 Reste kürzer. Dabei fehlen 80 Reste im Verbindungsstück zwischen den Helices 90:114 und 123:143 der Domäne 3. Weitere 60 Reste fehlen in der Domäne 3, fünf bzw. sieben in dem Bereich nach den Helices 277:298 (Domäne 3) bzw. 351:362 (Domäne 2) und 10 weitere wurden in der Helix 351:362 (Domäne 2) herausgeschnitten.

Das [NiFe]-Zentrum, an dem H₂ oxidiert wird, liegt im Inneren des Proteins und seine Struktur entspricht derjenigen in anderen strukturell untersuchten [NiFe]-Hydrogenasen. Das Nickel und das Eisen liegen in der Struktur Nativ (wie isoliert) 2,8 Å voneinander entfernt und werden von den Resten Cys66 und Cys383 verbrückt (Abbildung 31 B, Abbildung 32). Zusätzlich ist das Nickel zu Cys63 und Cys380 und das Eisen zu drei anorganischen Liganden, vermutlich zwei CN⁻ und ein CO, koordiniert. Die Interpretation der Eisenliganden basiert maßgeblich auf IR-spektroskopischen und strukturellen Daten anderer [NiFe]-Hydrogenasen. Das erste CN⁻ bildet eine Wasserstoffbrücke mit Thr351-NH und OG1 und das zweite CN⁻ mit Arg328-NH und dessen positiv geladenen Guanidinogruppe. In der oxidierten Struktur, die sonst sehr ähnlich zu der „wie isolierten“-Struktur ist, hat das erste CN⁻ einen höheren Temperaturfaktor (Abbildung 31 C). Eine teilweise Entfernung des ersten CN⁻ könnte durch IR-spektroskopische Untersuchungen bestätigt werden. CO ist ca. 3,3 Å von Asp331-OD1 entfernt, aber mit diesem aus geometrischen nicht wasserstoffverbrückt. Asp331 ist vermutlich geladen, da es Wasserstoffbrücken zu His70 und His333 ausbildet. Interessanterweise ist Asp331 in den anderen [NiFe]-Hydrogenasen der Gruppe 1 nicht konserviert und meist für ein Leucin ausgetauscht. Im Gegensatz dazu sind die Reste, die mit den beiden CN⁻ Liganden interagieren, konserviert.

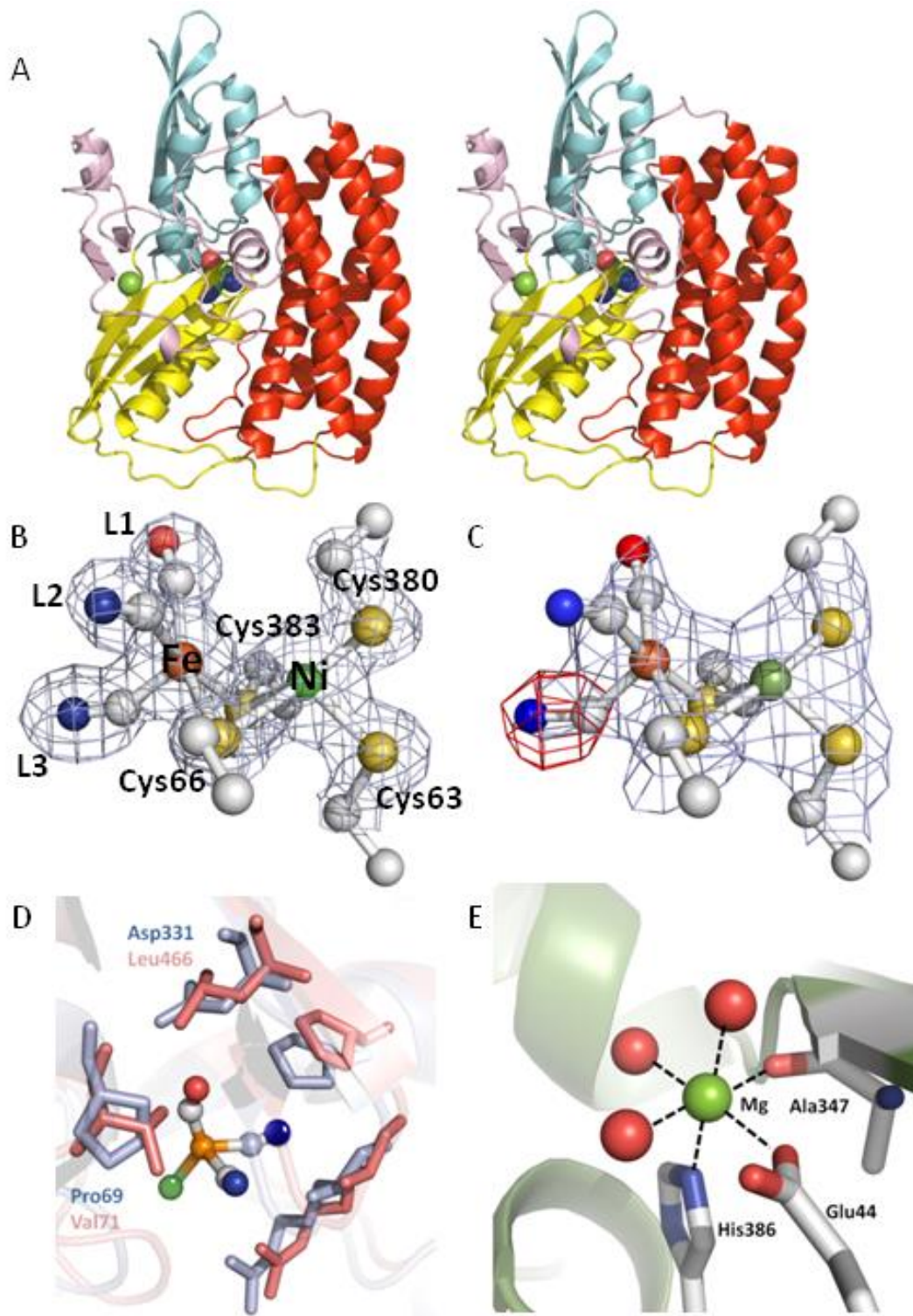


Abbildung 31: Metallliganden der großen Untereinheit FrhA. A: Stereobild von FrhA. Zwischen Domäne 2, 3 und 4 liegt das [NiFe]-Zentrum. Das zusätzliche Metall (Mg^{2+}) liegt an der Proteinoberfläche zwischen den Domänen 1 und 4. Die Domänen von FrhA sind übersichtshalber unterschiedlich gefärbt (Domäne 1: blau; Domäne 2: gelb; Domäne 3: rot; Domäne 4: rose). B: [NiFe]-Zentrum von FrhABG „wie isoliert“ mit seiner Elektronendichte, dargestellt bei $1,5 \sigma$. Das Nickel (grün) ist $2,8 \text{ \AA}$ vom Eisen (orange) entfernt. Dieses wird von wahrscheinlich einem CO (L1) und zwei CN^- (L2 und L3) umgeben. C: [NiFe]-Zentrum von FrhABG „oxidiert“ mit definierter Elektronendichte, dargestellt bei $1,5 \sigma$. L3 ist von negativer Elektronendichte (in rot) umgeben. D: Detailansicht des [NiFe]-Zentrums und seiner Umgebung. Dargestellt ist ein Strukturvergleich von FrhA (blau) mit der großen Untereinheit von *D. gigas* (PDB-Code: 1frv, rot). Pro69 und Asp331 liegen in Standardhydrogenasen nicht konserviert vor. E: Detailansicht von Mg^{2+} -und dessen oktaedrische Koordinierung durch Glu44, Ala347, His386 und drei Wassermolekülen.

59

60

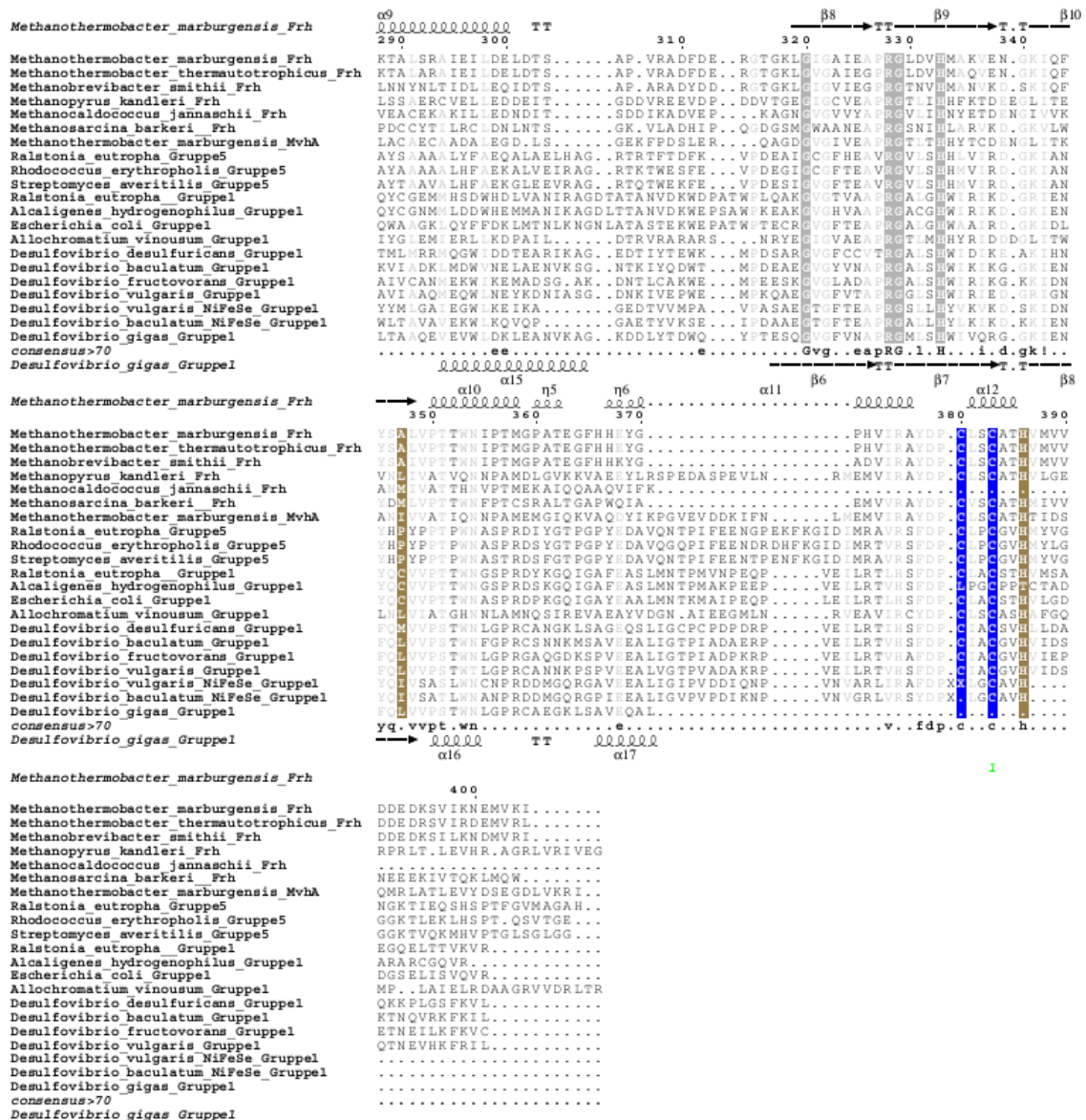


Abbildung 32: Sequenzvergleich von FrhA unterschiedlicher Methanogener und der großen Untereinheiten von [NiFe]-Hydrogenasen deren Strukturen bereits bekannt sind und Mitgliedern der Gruppe5. Strikt konservierte und meistens konservierte Aminosäurereste sind in Groß- und Kleinbuchstaben unter der Sequenz hervorgehoben. Der Sequenzvergleich erfolgte mit Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Für die Sekundärstrukturzuweisung wurden die Koordinaten von FrhA (über den Sequenzen) und von der großen Untereinheit aus *D. gigas* (unter den Sequenzen, PDB-Code: 1frv) mit Hilfe von ESPRIPT (<http://esript.ibcp.fr/ESPrIPT/ESPrIPT/>) herangezogen. (→, β-Faltblatt; ℓℓℓ, α-Helix; T, Turn (Kehre). Aminosäuren, die an der Koordinierung des [NiFe]-Zentrums und Mg^{2+} beteiligt sind, sind in blau bzw. in braun dargestellt.

Außerdem unterscheidet sich der N-terminale Teil der Helix 67:82, der sehr nah am [NiFe]-Zentrum liegt, deutlich von anderen bekannten Strukturen. Pro67 in FrhA, das ebenfalls in *A. vinosum* und in [NiFeSe]-Hydrogenasen gefunden wurde, ist meist durch ein Threonin ausgetauscht. Ile68 in FrhA ist in den strukturell bekannten [NiFe]-Hydrogenasen meist durch Tyrosin oder Glycin und in den [NiFe]-Hydrogenasen der Gruppe 5 durch Aspartat ersetzt. Ein mittelgroßer, ungeladener Rest

(Val, Ser, Thr oder Ala) in Position 69 in unmittelbarer Nähe zum [NiFe]-Zentrum ist in FrhA gegen Prolin ausgetauscht.

Das C-terminale Ende von FrhA befindet sich das konservierte Bindemotiv DPCxxCxxH. Da His386 die letzte sichtbare Aminosäure in der Elektronendichte von FrhA ist, wird die Kette vermutlich posttranslational von der Endopeptidase FrhD nach His386, analog zu anderen Hydrogenasen, abgeschnitten (Ogata et al. 2009). His386 ligiert zusammen mit Glu44, Ala347 und drei Wassermolekülen ein Metallion, möglicherweise Mg^{2+} , in einer oktaedrischen Anordnung und fixiert so das C-terminale Ende an der Proteinoberfläche (Abbildung 31 D).

3.3.3 FrhG

FrhG (40–275) startet deswegen mit der Aminosäure 40, weil bei der Annotierung des Genoms mit dem falschen Startcodon begonnen wurde. Es stellte sich später heraus, dass Val39 das richtige Startcodon ist und folglich nur sechs Reste in der Kristallstruktur fehlen. FrhG setzt sich strukturell aus zwei Domänen zusammen. Die N-terminale Flavodoxin-ähnliche Domäne (40–202) besteht aus einem drei-strängigen parallelen β -Faltblatt, das von kurzen α -Helices flankiert wird. Damit ist dieser Teil strukturell ähnlich zu den bereits bekannten kleinen Untereinheiten der [NiFe]-Hydrogenasen (Abbildung 33, Abbildung 37). Die Standardabweichung der Atompositionen zu den am nächsten verwandtesten Familienmitgliedern von *E. coli* und *D. desulfuricans* beträgt 2,2–2,3 Å. Dieser N-terminale Teil trägt das proximale [4Fe4S]-Cluster, welches in den meisten Standardhydrogenasen von vier Cysteinen koordiniert ist.

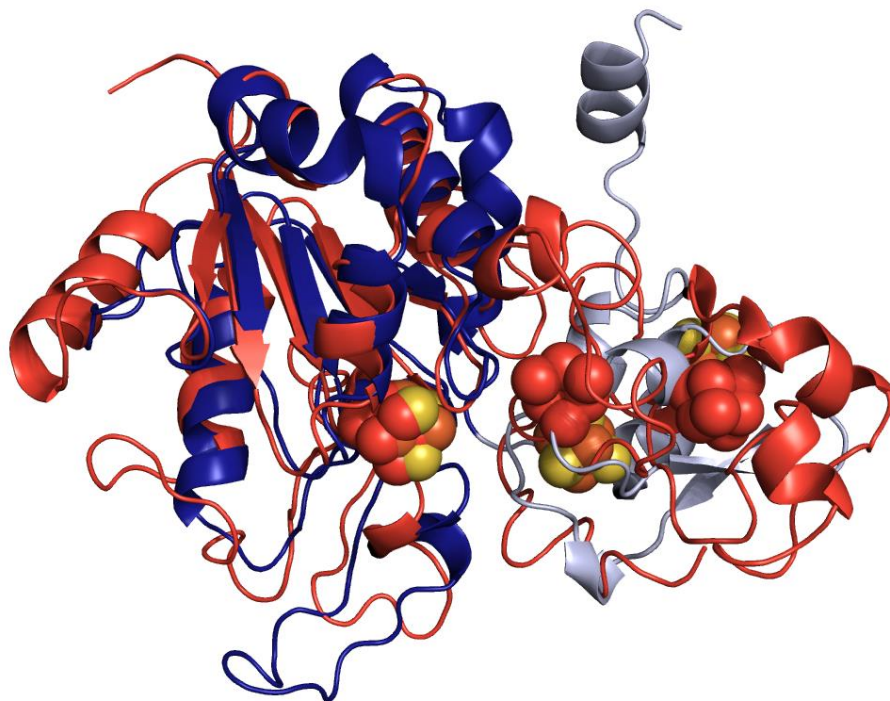


Abbildung 33: Strukturelle Ähnlichkeit von FrhG mit der kleinen Untereinheit von Standardhydrogenasen. FrhG (in grau und blau dargestellt) zeigt im N-terminus strukturelle Ähnlichkeit zu der kleinen Untereinheit von *D. gigas* (PDB-Code: 1frv, in rot dargestellt). Der C-terminale Teil zeigt eine andere Faltung. Die medialen und distalen Cluster der beiden Strukturen unterscheiden sich in ihrer Faltung.

Dieser N-terminale Teil trägt das proximale $[4\text{Fe}4\text{S}]$ -Cluster, welches in den meisten Standardhydrogenasen von vier Cysteinen koordiniert ist. In den erst kürzlich untersuchten sauerstofftoleranten $[\text{NiFe}]$ -Hydrogenasen aus aeroben H_2 -Oxidierern (Fritsch et al. 2011; Shomura et al. 2011; Volbeda et al. 2012) wird dieses Cluster jedoch von sechs Cysteinen koordiniert. In FrhG wurde eins dieser konserviert vorliegenden Cysteine (Cys57, Cys132 und Cys171) durch Asp60 ersetzt (Abbildung 34). Dieses Aspartat wurde auch durch Sequenzvergleiche in den bisher noch nicht strukturell untersuchten hochaffinen $[\text{NiFe}]$ -Hydrogenasen der Gruppe 5 und einigen anderen Methanogenen als potentieller Ligand identifiziert. Ein Aspartat als Ligand von $[4\text{Fe}4\text{S}]$ -Clustern wurde bisher nur in drei Enzymen beschrieben: in den Ferredoxinen von *P. furiosus* (Calzolari et al. 1995) und *T. profundus* (Imai et al. 2001), in der lichtunabhängigen Protochlorophyllid Reduktase BchN-BchB (PDB-Code: 3aeu; (Muraki et al. 2010)) und in dem Transkriptionsregulator Fnr von *Bacillus subtilis* (Gruner et al. 2011). Durch diese eher ungewöhnliche Koordination wird Glu102 vom $[4\text{Fe}4\text{S}]$ -Clusters weggedreht und geht Wasserstoffbrücken zu His53 und Tyr51 ein, die ebenfalls in den anderen bekannten Strukturen fehlen. Um diese Wechselwirkung zu ermöglichen, wurde ein konserviert vorliegendes Glutamat in Position 57 in FrhA gegen ein Glycin ausgetauscht. Cys57, Ser131, $\alpha\text{His}149$ aus FrhA und Gly170 wechselwirken mit den Schwefeln des proximalen $[4\text{Fe}4\text{S}]$ -Clusters und sind konserviert. In einem Abstand von ca. 4,4 Å liegt neben dem proximalen Cluster ein weiteres Cystein (Abbildung 34). Im Gegensatz zu FrhABG ist dieses Cystein in den sauerstofftoleranten $[\text{NiFe}]$ -Hydrogenasen an der Koordinierung des $\text{Fe}3$ des proximalen $[4\text{Fe}3\text{S}]$ -Clusters beteiligt (Abbildung 37). Mutationsstudien zeigten jedoch kürzlich, dass diesem Cystein nur eine begrenzte Bedeutung für die Sauerstofftoleranz zukommt (Fritsch et al. 2011).

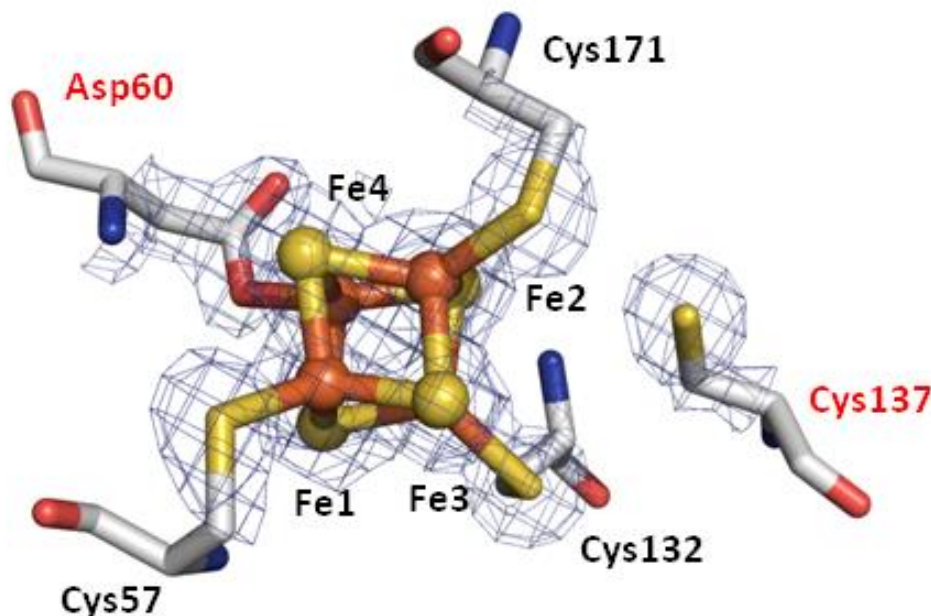


Abbildung 34: Proximales $[4\text{Fe}4\text{S}]$ -Cluster. Das proximale $[4\text{Fe}4\text{S}]$ -Cluster wird von Cys57, Cys137, Cys171 und durch Asp60 koordiniert. Cys137, das 4,4 Å vom proximalen Cluster entfernt liegt, ist in O_2 -toleranten $[\text{NiFe}]$ -Hydrogenasen an der Koordinierung des proximalen $[4\text{Fe}3\text{S}]$ -Clusters beteiligt.

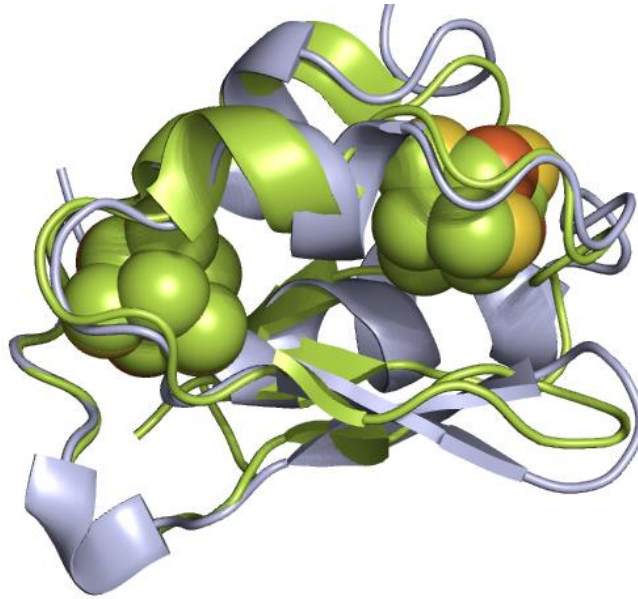


Abbildung 35: Strukturelle Ähnlichkeit des C-terminalen Teils von FrhG mit Ferredoxin. FrhG (in grau und [4Fe4S]-Cluster in orange/gelb dargestellt) zeigt im Bereich des medialen und distalen [4Fe4S]-Clusters strukturelle Ähnlichkeit zum Ferredoxin aus *P. asaccharolyticus* (PDB-Code: 1dur, in grün dargestellt). Das mediale [4Fe4S]-Cluster von FrhG überlagert vollständig mit dem [4Fe4S]-Cluster des Ferredoxins.

Eine ca. 18 Å lange Helix aus 12 Resten (Met190 – Gly201), die in der Standardhydrogenase nicht konserviert ist, verbindet die Flavodoxin-Domäne mit der Ferredoxin-ähnlichen Domäne (203-275) (Abbildung 35). In diesem Teil werden das mediale und distale [4Fe4S]-Cluster von FrhG durch vier Cysteine koordiniert, welche aufgrund ihrer charakteristischen C_{x2}C_{x2}C_{x29}C (medial, Cys230, 249, 252, 255) bzw. C_{x2}C_{x2}C_{x19}C (distal, Cys220, 223, 226, 259)-Bindemotive bereits in der Sequenz detektierbar sind (Abbildung 36). Sequenzen von F₄₂₀-reduzierenden [NiFe]-Hydrogenasen aus anderen Methanogenen zeigen ebenfalls dieses Ferredoxinmotiv (Abbildung 37). Beide Cluster sind durch eine N-terminale Helix und ein zweisträngiges β-Faltblatt vom Solvent abgeschildert. Analog zu anderen bekannten Ferredoxinstrukturen sind die beiden Cluster in eine hydrophobe Tasche eingebettet und bilden vier bis fünf polare Interaktionen mit Stickstoffatomen der Polypeptidkette aus. FrhG ist die erste strukturell bekannte [NiFe]-Hydrogenase, die diese Ferredoxin-ähnliche Domäne enthält (Abbildung 37). Die Ferredoxin-ähnliche Domäne von FrhG ähnelt am meisten dem Ferredoxin aus *P. asaccharolyticus* (PDB-Code: 1dur; Abbildung 35 und Abbildung 37). Die Durchschnittsabweichung der Atompositionen beträgt 1,7 Å für 87% der Cα-Atome.

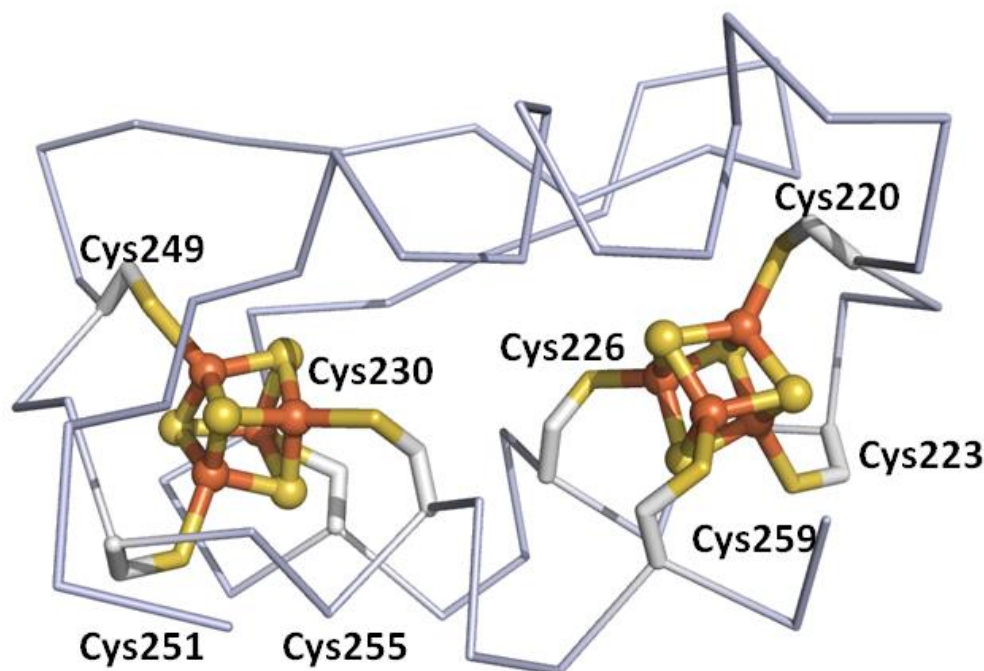


Abbildung 36: Mediales und distales Cluster. Das mediale und distale Cluster, koordiniert von Cysteinen, sind in ein Proteingerüst eingebettet, das eine Ferredoxin-Struktur aufweist. Außerdem sind die beiden $[4Fe4S]$ -Cluster so gedreht, dass jeweils zwei Eisen eines jeden Clusters aufeinander gerichtet sind.

Das mediale $[4Fe4S]$ -Cluster in FrhG unterscheidet sich auch von denen der anderen $[NiFe]$ -Hydrogenasen. Bei den bisher bekannten Strukturen liegt überwiegend ein $[3Fe4S]$ -Cluster vor. Ein mediales $[4Fe4S]$ -Cluster wurde bisher nur noch in den $[NiFeSe]$ -Hydrogenasen von *D. baculatum* (Garcin et al. 1999) und *D. vulgaris* Hildenborough (Valente et al. 2005; Matias et al. 2010) charakterisiert. Das teilweise helikale C-terminale Ende von FrhG erstreckt sich vom distalen Cluster bis zum N-terminalen Ende von FrhB.

<i>Methanothermobacter_marburgensis_Frh</i>	40	50
<i>Methanothermobacter_marburgensis_Frh</i>AEENA.....KPRIGYIHL	
<i>Methanothermobacter_thermautotrophicus_Frh</i>MSLIARIKRFGLAEAEAKREEPEKEKSE.....PVGASKEEVEKVAEENA.....KPRIGYIHL	
<i>Methanobrevibacter_smithii_Frh</i>MFDKIRKAPGGSEKPKAETKQIESAPEVETAPVAETKQETATNPRIQYIHL	
<i>Methanopyrus_kandleri_Frh</i>MURWRLSRAKTKSTPRSSCDVAYIQL	
<i>Methanocaldococcus_jannaschii_Frh</i>MKVVK.....VAHQQL	
<i>Methanosarcina_barkeri_Frh</i>MTNRIKIGHVHM	
<i>Peptostreptococcus_asacharolyticus_Ferredoxin</i>		
<i>Methanothermobacter_marburg_MvhG</i>MAEQAVPYGRKTQHTPALKE.....MAEKIRIGTWWL	
<i>Ralstonia_eutropha_Gruppe5</i>MKAADMDTQKSTAGTTAEPAESAATPESAAKAEETLHVLI	
<i>Rhodococcus_erythropolis_Gruppe5</i>MTAATPDTVG.AADAGGAPADETPT.....IHLWI	
<i>Streptomyces_avermitilis_Gruppe5</i>MVFETFEVMRRQGISRRSFLKYCSLTATSLGLGPSFLP.....QIAHAMETAPPTPVLWL	
<i>Ralstonia_eutropha_Gruppe1</i>MIETFEVEMRRQGISRRSFLKYCSLTATSLGLSPVFVP.....KIVHAMETAPPTPVLWL	
<i>Alcaligenes_hydrogenophilus_Gruppe1</i>LENAKRIIPVVI	
<i>Escherichia_coli_Gruppe1</i>MKFSVGLGKEGAEERLASRGVSRDDFLKFCSTVAVAMGMGPAPAP.....EVARALTSGKRPVSVYL	
<i>Allochrocatium_vinosum_Gruppe1</i>MKFSVGLGKEGAEERLASRGVSRDDFLKFCSTVAVAMGMGPAPAP.....KIALALTSPTRPSVSVWL	
<i>Desulfovibrio_desulfuricans_Gruppe1</i>MNFVSVGLGRDDAEKRLVQNGVSRDDFMKFCATVAAAMGMGPAPAP.....KVAEALTAHHPVSVWL	
<i>Desulfovibrio_baculatum_Gruppe1</i>MNALAQLVARRAEA.....EERGVSRRDFLKFCGMVAVAMGLEASMGAA.....QIARALEGKKRPVSVYL	
<i>Desulfovibrio_fructosovorans_Gruppe1</i>MSLTRDDFVKLCTGTVAGFGISQMFHPAVHEALAGTLTGEPVFPWL	
<i>Desulfovibrio_vulgaris_NiFeSe_Gruppe1</i>MTEGAKRAPVIVV	
<i>Desulfovibrio_baculatum_NiFeSe_Gruppe1</i>LTAKKRPVSVYL	
<i>Desulfovibrio_gigas_Gruppe1</i>k.k.i.vvwl	
<i>consensus>50</i>		
<i>Desulfovibrio_gigas_Gruppe1</i>		

Methanothermobacter_marburgensis_Frh

Methanothermobacter marburgensis Frh
Methanothermobacter thermototrophicus_Frh
Methanobrevibacter_mithii_Frh
Methanopyrus kandleri Frh
Methanocaldococcus jannaschii Frh
Methanosarcina barkeri Frh
Peptostreptococcus ascharyoliticus_Ferredoxin
Methanothermobacter marburg_MvHs
Ralstonia eutropha Gruppe5
Rhodococcus erythropolis Gruppe5
Streptomyces avermitilis Gruppe5
Ralstonia eutropha Gruppe1
Alcaligenes hydrogenophilus_Gruppe1
Escherichia coli Gruppe1
Allochromatium vinosum Gruppe1
Desulfovibrio desulfuricans Gruppe1
Desulfovibrio baculatum Gruppe1
Desulfovibrio fructosovorans Gruppe1
Desulfovibrio gigas Gruppe1
Desulfovibrio vulgaris_NiFeS_Gruppe1
Desulfovibrio baculatum_NiFeS_Gruppe1
Desulfovibrio_gigas_Gruppe1
consensus>50
Desulfovibrio gigas Gruppe1

Methanothermobacter_marburgensis_Frh

Methanothermobacter marburgensis_Frh
Methanothermobacter thermotrophicus_Frh
Methanobrevibacter smithii_Frh
Methanopyrus kandleri_Frh
Methanocaldococcus jannaschii_Frh
Methanosarcina barkeri_Frh
Peptostreptococcus ascharyolyticus_Ferredoxin
Methanothermobacter marburg_MvHG
Ralstonia eutropha_Group5
Rhodococcus erythropolis_Group5
Streptomyces avermitilis_Group5
Ralstonia eutropha_Group6
Alcaligenes hydrogenophilus_Group6
Escherichia coli_Group6
Allochromatium vinosus_Group6
Desulfovibrio desulfuricans_Group6
Desulfovibrio baculatum_Group6
Desulfovibrio fructosovorans_Group6
Desulfovibrio vulgaris_Group6
Desulfovibrio vulgaris_Group6
Desulfovibrio baculatum_NiFeSe_Group6
Desulfovibrio gigas_Group6
consensus>50
Desulfovibrio gigas_Group6

Methanothermobacter_marburgensis_Frh

Methanothermobacter marburgensis Frh
Methanothermobacter thermotautotrophicus Frh
Methanobrevibacter smithii Frh
Methanopyrus kandleri Frh
Methanocaldococcus jannaschii Frh
Methanosarcina barkeri Frh
Peptostreptococcus asaccharolyticus Ferredoxin
Methanothermobacter marburg MvHG
Ralstonia eutropha Grupp5
Rhodococcus erythropolis Gruppe5
Streptomyces avermectinicus Gruppe5
Ralstonia eutropha Gruppel
Alcaligenes hydrogenophilus Gruppel
Escherichia coli Gruppel
Allochrochromatium vinosum Gruppel
Desulfovibrio desulfuricans Gruppel
Desulfovibrio baculatum Gruppel
Desulfovibrio fructosovorans Gruppel
Desulfovibrio vulgaris Gruppel
Desulfovibrio vulgaris M28Se Gruppel
Desulfovibrio gigas Gruppel
Desulfovibrio gigas Gruppel
consensus>50
Desulfovibrio gigas Gruppel

Methanothermobacter marburgensis Frh

Methanotermobacter marburgensis_Frh
Methanotermobacter marburgensisautotrophicus_Frh
Methanorebivibacter_mithii_Frh
Methanopyrus kandleri_Frh
Methanocaldococcus jannaschii_Frh
Methanosarcina barkeri_Frh
Peptostreptococcus asaccharolyticus_Ferredoxin
Methanotermobacter marburg_MvHG
Ralstonia eutropha_Group5
Rhodococcus erythropolis_Group5
Streptomyces_erythropolis_Group5
Ralstonia eutropha_Group6
Alcaligenes hydrogenophilus_Group6
Escherichia coli_Group6
Allochromatium vinosum_Group6
Desulfovibrio desulfuricans_Group6
Desulfovibrio baculatum_Group6
Desulfovibrio fructosovorans_Group6
Desulfovibrio vulgaris_Group6
Desulfovibrio vulgaris_MiFeSe_Group6
Desulfovibrio baculatum_MiFeSe_Group6
Desulfovibrio gigas_Group6
consensus>50
Desulfovibrio gigas_Group6

[illegible]

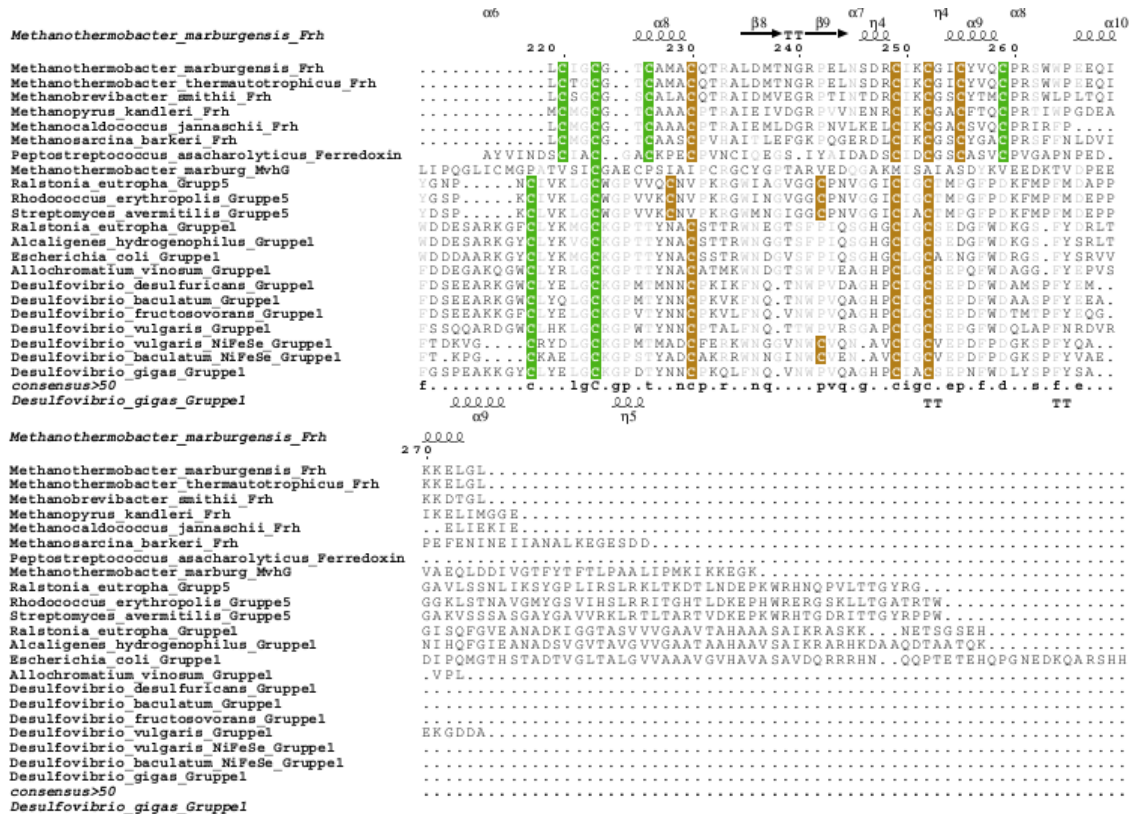
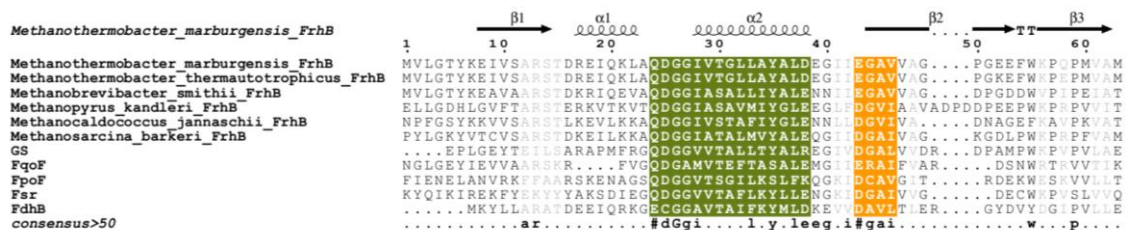


Abbildung 37: Sequenzvergleich von FrhG unterschiedlicher Methanogener und der kleinen Untereinheiten von [NiFe]-Hydrogenasen deren Strukturen bereits bekannt sind und Mitgliedern der Gruppe 5. Strikt konservierte und meistens konservierte Aminosäurereste sind in Groß- und Kleinbuchstaben unter der Sequenz hervorgehoben. Der Sequenzvergleich erfolgte mit Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Für die Sekundärstrukturzuweisung wurden die Koordinaten von FrhG (über den Sequenzen) und von der kleinen Untereinheit aus *D. gigas* (unter den Sequenzen, PDB-Code: 1frv) mit Hilfe von ESPRIPT (<http://esprpt.ibcp.fr/ESPrpt/ESPrpt/>) herangezogen. (→, β -Faltblatt; $\ell\ell\ell$, α -Helix; T, Turn (Kehre). Aminosäuren, die an der Koordinierung des proximalen, medialen und distalen Clusters beteiligt sind, sind in lila, braun und in grün dargestellt. Asp60, das in *M. marburgensis* das proximale Cluster koordiniert, und Cys137, das in *M. marburgensis* neben dem proximalen Cluster liegt und in O₂-toleranten [NiFe]-Hydrogenasen von *R. eutropha*, *A. hydrogenophilus* und *E. coli* an der Koordination des [4Fe3S]-Clusters beteiligt ist, sind in orange dargestellt.

3.3.4 FrhB

FrhB (2-281) kommt in den strukturell bereits bekannten [NiFe]-Hydrogenasen der Gruppe 1 nicht vor, die generell aus zwei Untereinheiten bestehen. Jedoch ist FrhB homolog zu anderen F₄₂₀-reduzierenden Enzymen der FrhB-Familie (Abbildung 38). Von den Mitgliedern sind bisher noch keine Strukturen bis auf das Sekundärstrukturmodell der Cryo-EM (3.2.4) bekannt.



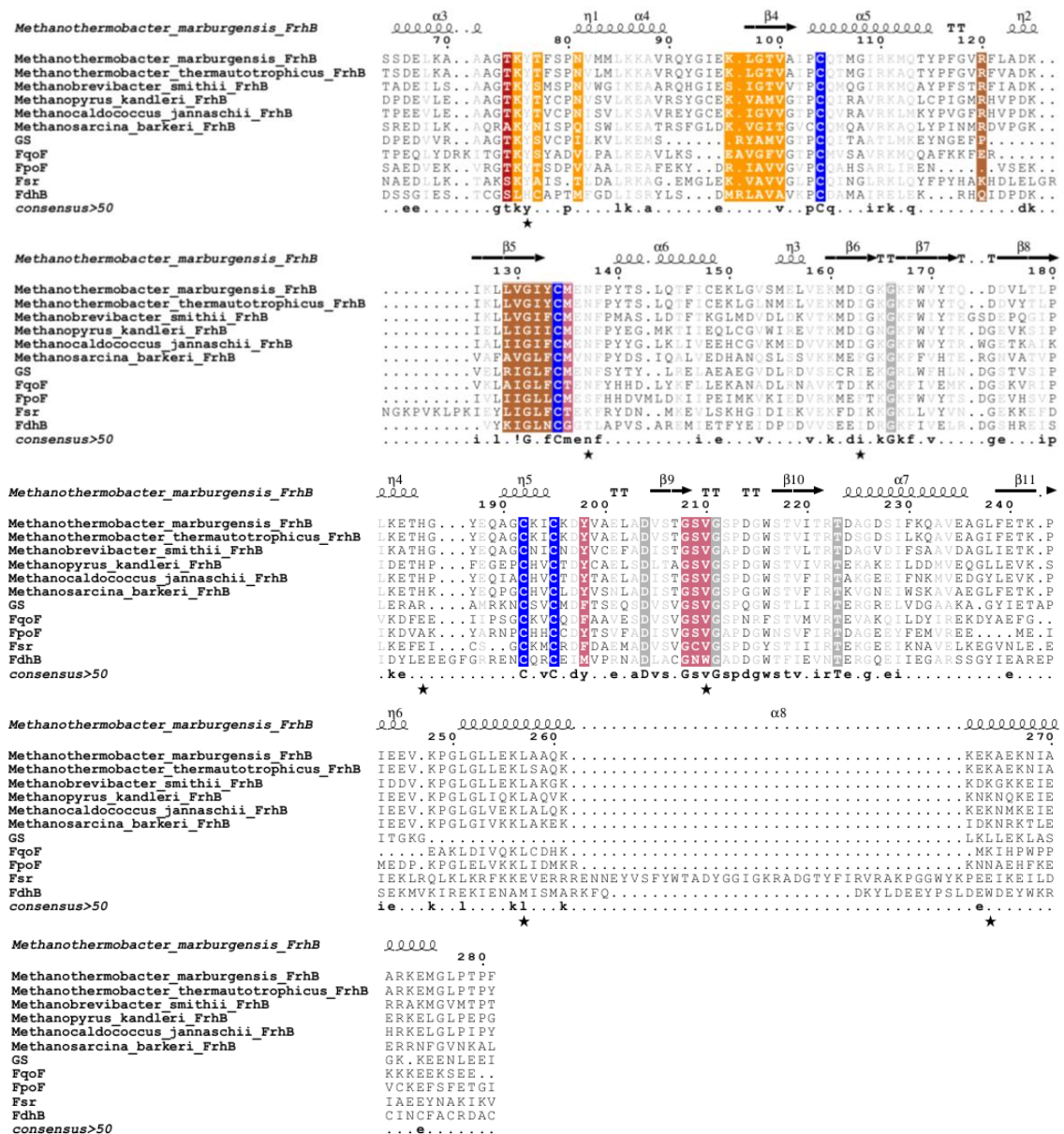


Abbildung 38: Sequenzvergleich von FrhB aus Methanogenen und anderen Mitgliedern der FrhB-Familie. Dazu gehören: GS, die F_{420} -abhängige Glutaminsynthase von *M. marburgensis*, ADL58239; FqoF, die $F_{420}H_2$:Quinon-Oxidoreduktase Untereinheit F von *Archaeoglobus fulgidus* DSM 4304, NP_070660; FpoF, die $F_{420}H_2$:Phenazin-Oxidoreduktase Untereinheit F von *Methanosarcina barkeri* Stamm Fusaro, YP_303819; Fsr, die N-terminale Domäne von Fsr, der F_{420} -reduzierende Sulfat-Reduktase von *Methanocaldococcus jannaschii* DSM 2661, Y870_METJA; FdhB: die β -Untereinheit der Formiat-Dehydrogenase von *M. marburgensis*, YP_003850414. Strikt konservierte und meistens konservierte Aminosäurereste sind in Groß- und Kleinbuchstaben unter der Sequenz hervorgehoben. Der Sequenzvergleich erfolgte mit Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Für die Sekundärstrukturzuweisung wurden die Koordinaten von FrhB (über den Sequenzen) mit Hilfe von ESPRIPT (<http://esprpt.ibcp.fr/ESPrpt/ESPrpt/>) herangezogen. (→, β -Faltblatt; α , α -Helix; T, Turn (Kehre)). Aminosäuren die an der Koordinierung des $[4Fe4S]$ Clusters beteiligt sind, sind in blau dargestellt. Die Reste, die an der FAD Bindung beteiligt sind, sind in grün (Pyrophosphat), gelb (Adenin), rot (Ribitol), braun (Isoallaxinring) und rosa (Pyridin) dargestellt.

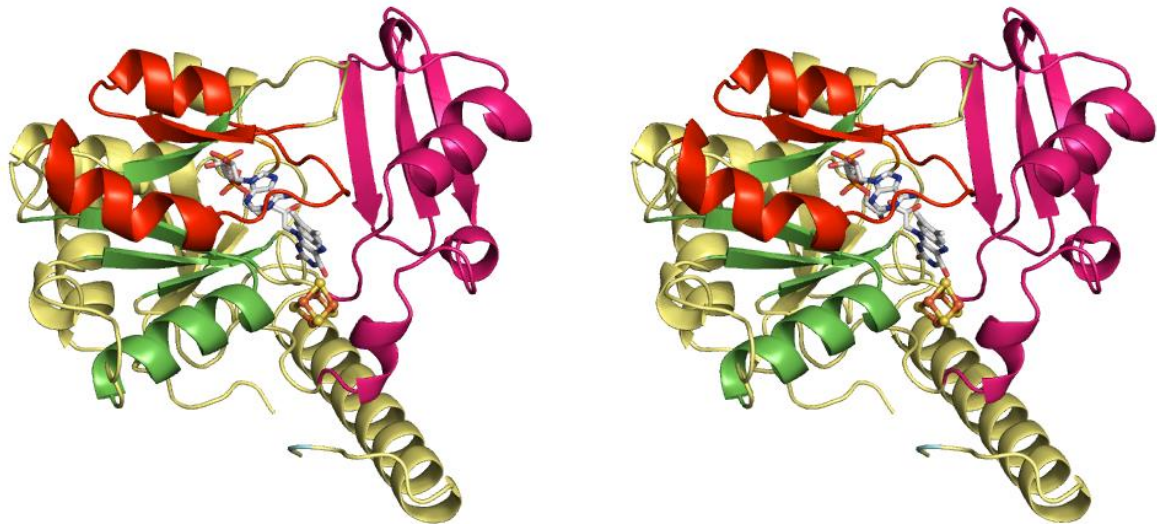


Abbildung 39: Struktur von FrhB in stereo. Der Kernbereich von FrhB hat die Topologie $\beta 1\beta 2\alpha 1\beta 3$ (Insertion). Die β -Stränge und die α -Helix sind in grün, das Insertionselement I ist in magenta, das Insertionselement II (auch β -Mäander Subdomäne) in rot dargestellt.

FrhB besteht aus einem acht-strängigen β -Faltblatt, das von fünf α -Helices flankiert wird (Abbildung 39). Der Kernbereich von FrhB hat die Topologie $\beta 1\beta 2\alpha 1\beta 3$ (I, Insertion). Die vier parallelen β -Stränge sind direkt an der später beschriebenen FAD-Bindung beteiligt. Das erste Insertionselement besteht aus einer Helix und zwei antiparallelen β -Strängen, die am Ende des β -Faltblatts liegen. Das zweite Insertionssegment wird aufgrund seines $\alpha\beta\beta$ Faltungsmotivs (137-195) als β -Mäander-Subdomäne bezeichnet und deckt die C-terminale Seite des zentralen Faltblatts ab. Ein weiteres auffälliges Strukturelement stellt eine Helix(67-71)-Loop-Helix(84:90)-Brücke dar, die oberhalb der C-terminalen Seite des Faltblattkerns gestülpt ist und die Stränge 57:63 und 96:101 miteinander verbinden.

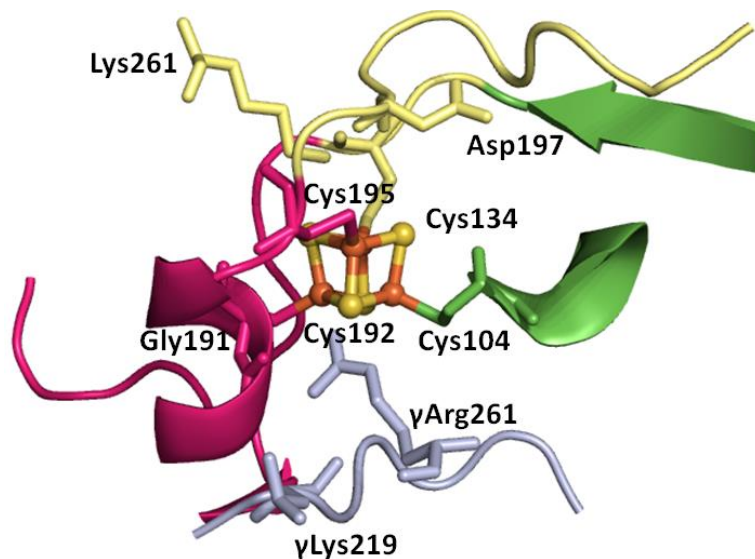


Abbildung 40: Umgebung des [4Fe4S]-Cluster in FrhB. Das [4Fe4S]-Cluster wird durch Cys104, Cys134, Cys192 und Cys195 koordiniert und ist von dem Insertionselement I (magenta), dem Verbindungsstück der β -Mäander Subdomäne (gelb), von der β -Mäander Subdomäne (grün) und einem Teil einer Polypeptidkette von FrhG (blau) umgeben. Das Cluster wird von den zwei positiv geladenen Resten Lys261 und γ Arg261 direkt kontaktiert und von Cys134 und Asp197 bzw. durch Gly191 und γ Leu219 in ihrer Position gehalten.

Ein charakteristisches Merkmal von FrhB ist eine 35 Å lange C-terminale Helix, die an der Proteinoberfläche liegt. Auffällig ist die Anhäufung von Lysinen (Lys 182, 248, 256, 261, 262, 264, 267 und 273) und Leucinen (Leu 251, 253, 254 und 257) in dieser Helix.

Das [4Fe4S]-Cluster wird durch vier Cysteine (Cys104, Cys134, Cys192 und Cys195) koordiniert und liegt in einer Tasche an der Grenze zwischen FrhB und FrhG (Abbildung 40). Die Tasche wird von dem N-terminalen Ende der Helix 104:114, dem Verbindungsstück zur und von der β -Mäander Subdomäne, der β -Mäander Subdomäne selbst und dem Polypeptidbereich 219:225 von FrhG umgeben. Der letzte Bereich ist auch an der Koordinierung des distalen [4Fe4S]-Clusters beteiligt (Abbildung 40). Das [4Fe4S]-Cluster von FrhB steht mit auffällig vielen positiv geladenen Resten in Kontakt. Lys261-NZ ist nur 3,3 Å von seinem Schwefel S1 und dem Eisen Fe2 entfernt und wird durch Wasserstoffbrücken mit Cys134-O und Asp197-O in seiner Position gehalten. Cys104-NH liegt am N-terminalen Ende der Helix 103:114 und interagiert ebenfalls mit S1. Auf der anderen Seite des [4Fe4S]-Clusters steht S2 in Kontakt zu γ Arg261-NH2 von FrhG. Dabei wird γ Arg261 durch Gly191-O und γ Leu219-O fixiert. Die positive geladene Umgebung des Clusters stabilisiert vorzugsweise ein reduziert vorliegendes [4Fe4S]-Cluster. Dieser Befund entspricht dem negativen Redoxpotential sowohl des FrhABG Komplexes, als auch der heterolog produzierten FrhB Untereinheit (Abschnitt 3.1 und 3.4.2).

Mit einem Abstand von ca. 5,6 Å vom [4Fe4S]-Cluster entfernt, liegt das FAD in einer flachen quaderförmigen Tasche (14 Å x 13 Å x 7 Å), umgeben von fünf starren β -Strängen (Abbildung 41). Die Architektur der FAD-Bindestelle entspricht nicht einer der vier charakterisierten FAD-haltigen Proteinfamilien (Dym und Eisenberg 2001). Die Solvens-zugängliche Tasche ist vor allem durch aromatische und ungeladene Reste ausgekleidet.

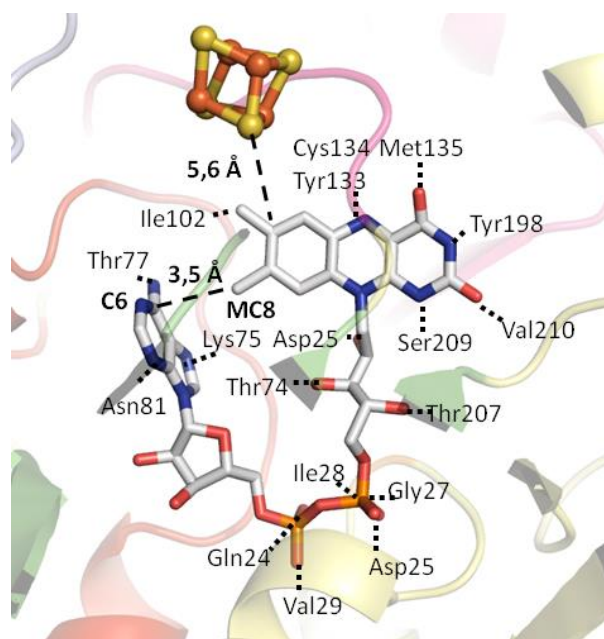


Abbildung 41: Bindung von FAD an FrhB. FAD bindet in eine quadratförmige Tasche in einer sogenannten Hufeisenkonformation.

Die FAD-Bindestelle liegt oberhalb dem C-terminalen Ende des zentralen β -Faltblattes, in der Nähe der langen Oberflächenhelix. An ihrer Oberseite liegt die β -Mäander-Domäne, die jedoch FAD nicht direkt kontaktiert. FAD bindet an das Polypeptid in einer Art Hufeisenkonformation, die bereits in anderen Proteinen gefunden wurde. Diese Anordnung führt dazu, dass das Atom C6 des Adenins nur 3,5 Å zum Atom C8M des Isoalloxazinring entfernt ist (Abbildung 41). Der Isoalloxazinring ist leicht gebogen und an dem Hydrid-transferierenden N5 ist eine kovalente Species gebunden, die in Richtung der Pro-S-Seite zeigt. Das FAD Addukt konnte bisher nicht identifiziert werden. Es könnte sich um einen Abkömmling von Trimethyl-N-Oxid handeln, dass als Additiv zur Verbesserung der Kristalle von FrhABG eingesetzt. In der Nähe der pro-S-Seite des Isoalloxazinrings befindet sich Tyr67, das jedoch für einen direkten Kontakt zu weit weg ist. Der Isoalloxazinring sitzt mit der flachen *re*-Seite auf dem Loop, der dem β -Strang 129:133 folgt (Abbildung 41) und wechselwirkt mit Ile102, Tyr133 und Cys134. Der Pyrimidinring von FAD, umgeben vom Strang 205:208 und dem nachfolgenden Loop, wird durch Wechselwirkungen mit Met135, Ser209 und Val210 an das Protein gebunden. Die Sauerstoffatome des Ribitols wechselwirken mit Asp25, Thr74 und Thr207. Der Pyrophosphatteil von FAD liegt am N-terminalen Ende der α -Helix 28:38. Dies ist ein gängiges FAD-Bindemotiv, da durch den Dipol der Helix die negative Ladung des Cofaktors kompensiert wird (Dym und Eisenberg 2001). Das Pyrophosphat wechselwirkt mit den Peptidstickstoffen von Gln24, Asp25, Gly26, Gly27, Ile28 und Val29. Das Adenin hingegen wird von den C-terminalen Ende der β -Stränge 43:46 und 96:100 eingehüllt. Dabei bilden sich Wasserstoffbrücken zwischen dem Pyrimidinring und Lys75, Thr77 bzw. Asn81 aus.

3.3.5 FrhABG Komplex

FrhABG stellt einen riesigen dodekamer Komplex mit einer molekularen Masse von 1250 kDa dar, der sich aus 12 Heterotrimeren zusammensetzt und eine würfelförmige Gestalt einnimmt (Abbildung 42). Ein FrhABG Heterotrimer stellt dabei die Grundeinheit dar und wird durch große Kontaktflächen sowie durch eine Vielzahl von Wechselwirkungen zwischen FrhA, FrhB und FrhG zusammengehalten (Tabelle 5 und 6). Die Untereinheiten FrhA/FrhG und FrhG/FrhB liegen im Heterotrimer nebeneinander und bilden mit jeweils 15% der Gesamtoberfläche die größten Kontaktflächen zueinander aus (Tabelle 5). Interessanterweise bestehen zwischen FrhA und FrhB trotz der kleinen Kontaktfläche 10 Salzbrücken.

Tabelle 5: Kontakte des FrhABG Heterotrimers. Die Kontaktflächen und Reste die an Salzbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind, wurden mittels PISA Interface ermittelt und anhand der FrhABG Kristallstruktur überprüft.

Heterotrimer	FrhA/FrhG	FrhG/FrhB	FrhB/FrhA
Kontaktfläche [Å²]	2295,3	2019,0	598,6
Anteil Gesamtoberfläche [%]	17,2	15,7	4,2
Salzbrücken	9	2	10
Wasserstoffbrücken	29	20	13

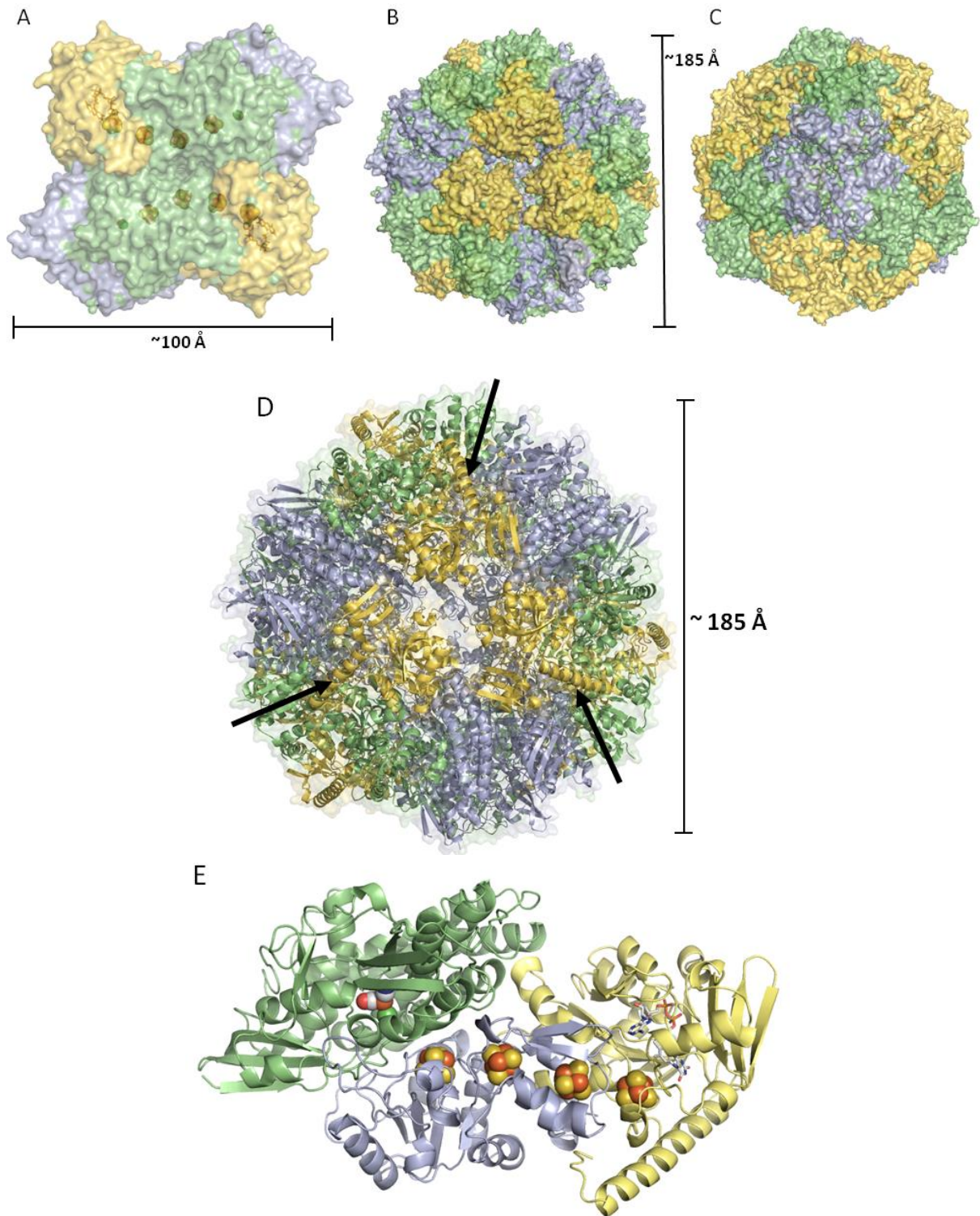


Abbildung 42: Struktur des FrhABG-Komplexes. Die FrhABG Struktur stellt einen 1250 kDa Enzymkomplex aus 12 FrhABG Heterotrimeren dar, die in einer tetrahedralen Symmetrie angeordnet sind. Jedes Heterotrimer besteht aus den Untereinheiten FrhA (blau), FrhB (gelb) und FrhG (grün) in einem Verhältnis 1 zu 1 zu 1. A: Zwei FrhABG Heterotrimeren lagern sich zu einem FrhABG Dimer zusammen, die so angeordnet sind, dass der Elektronentransfers entgegengesetzt verläuft. B: Der FrhABG Komplex ist in Richtung der dreizähligen Achse abgebildet, um die drei FrhB Untereinheiten aus drei unterschiedlichen FrhABG-Grundeinheiten angeordnet sind. Die drei FrhB Untereinheiten bilden keine Kontakte zueinander aus. Entlang der dreizähligen Achse befindet sich eine 10 Å² große Pore, die in das Innere des Komplexes führt. C: FrhABG-Komplex in Blickrichtung der dreizähligen Achse, um die sich drei FrhA aus drei unterschiedlichen Dimeren anlagern. D: Der Komplex - orientiert wie in B - ist als Sekundärstruktur und nicht als Oberflächenstruktur abgebildet. Die charakteristische 35 Å lange α-Helix von FrhB liegt an der Oberfläche des Komplexes (Pfeil). E: FrhABG Heterotrimer. Die [4Fe4S]-Cluster sind orange/gelb, Nickel grün, CO blau und CN⁻ rot dargestellt.

Tabelle 6: Salzbrücken im FrhABG Heterotrimer, zwischen den FrhABG Heterotrimeren die den Dimer aufbauen und zwischen den FrhABG Dimeren, die den Dodekamer aufbauen. Die Analyse erfolgte wie in Tabelle 5 beschrieben.

Salzbrücken im Heterotrimer			Salzbrücken im Komplex		
FrhA	Abstand [Å]	FrhG	FrhA	Abstand [Å]	FrhA
Lys135 [NZ]	2,9	Asp69 [OD1]	Arg274 [NH1]	3,0	Glu273 [OE2]
Lys135 [NZ]	3,8	Asp69 [OD2]	Asp225 [OD2]	4,0	Arg293 [NH2]
Arg120 [NH1]	2,9	Asp89 [OD1]	Salzbrücken im Dimer		
Arg120 [NH2]	3,5	Asp89 [OD2]	FrhG	Abstand	FrhG
Glu14 [OE2]	3,6	His53 [NE2]		[Å]	
Glu147 [OE2]	2,7	Arg233 [NH1]	Arg143 [NH1]	2,9	Glu243 [OE1]
Glu147 [OE2]	3,2	Arg233 [NH2]	Arg143 [NH2]	3,5	Glu243 [OE2]
Glu53 [OE2]	3,5	Arg248 [NE]	Arg241 [NE]	2,9	Glu153 [OE2]
Glu53 [OE2]	3,1	Arg248 [NH2]	Arg241 [NH2]	3,1	Glu153 [OE2]
FrhG		FrhB	Glu243 [OE1]	2,9	Arg143 [NH1]
Glu66 [OE1]	3,5	Arg120 [NH1]	Glu243 [OE2]	3,5	Arg143 [NH2]
Glu66 [OE2]	2,9	Arg120 [NH2]	Glu153 [OE2]	2,9	Arg241 [NE]
FrhB		FrhA	Glu153 [OE1]	3,4	Arg241 [NH2]
Lys86 [NZ]	2,8	Glu147 [OE2]	FrhA		FrhG
Lys87 [NZ]	2,9	Asp161 [OD2]	Lys50 [NZ]	3,0	Glu243 [OE2]
Arg90 [NE]	3,8	Asp142 [OD1]			
Arg90 [NH2]	2,9	Glu147 [OE1]			
Arg120 [NE]	2,9	Asp142 [OD1]			
Arg120 [NH2]	2,9	Asp142 [OD2]			
Glu43 [OE1]	3,9	Arg170 [NH1]			
Glu43 [OE2]	3,4	Arg170 [NH2]			
Glu95 [OE1]	2,7	Arg174 [NH2]			
Glu95 [OE2]	2,7	Arg174 [NH1]			

Die Seiten des Würfels bestehen aus dem Dimer zweier FrhABG Heterotrimeren, die um eine zweizählige Achse in einer Kopf-Schwanz-Anordnung zueinander orientiert sind und eine Außenfläche von $100 \times 100 \text{ Å}^2$ aufbauen (Abbildung 42 A). Diese Einheit repräsentiert eine Seite des kubischen Komplexes, der als tetrahedrale Symmetrie vorliegt. Ein Dimer stellt auch die Grundeinheit in anderen bekannten dodekameren Strukturen dar. Beim Aufbau des Dimeres sind alle Untereinheiten beteiligt (Tabelle 7). Die größte Kontaktfläche liegt zwischen zwei FrhG Untereinheiten mit $1042,9 \text{ Å}^2$ (8,6% der Gesamtoberfläche). Dabei werden insgesamt acht Salzbrücken und 17 Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet (Tabelle 6 und 7). Als Hauptkontaktregionen zwischen zwei Dimeren bzw. Würfelseiten sind die beiden FrhG Domänen, die Insertionsdomäne von FrhA und die $\alpha\beta\beta$ -Domäne bzw. die lange α -Helix von FrhB zu nennen. Die beiden FrhB Untereinheiten stehen nicht in Kontakt zueinander

Tabelle 7: Kontakte des FrhABG Dimers. Die Analyse erfolgte wie in Tabelle 5 beschrieben.

Dimer	FrhA/FrhA	FrhG/FrhG	FrhA/FrhG	FrhB/FrhA	FrhB/FrhG
Kontaktfläche [Å ²]	147,7	1042,9	123,7	251,7	404,6
Anteil Gesamtoberfläche [%]	1,3	8,6	0,9	1,8	3,2
Salzbrücken	—	8	1	—	—
Wasserstoffbrücken	—	17	—	4	2

Tabelle 8: Kontakte des FrhABG Komplexes. Die Analyse erfolgte wie in Tabelle 5 beschrieben.

Komplex	2-fach Achse	2-fach Achse
	[(FrhA)3]	[(FrhB)3]
Kontaktfläche [\AA^2]	2046	65,7
Anteil Gesamtoberfläche [%]	13,5	0,6
Salzbrücken	2	–
Wasserstoffbrücken	15	–

An den acht Würfecken des FrhABG Komplexes liegen dreizählige Achsen vor (Abbildung 42). An vier Ecken des Würfels kommen jeweils drei FrhB Untereinheiten und an den anderen vier Ecken jeweils drei FrhA Untereinheiten abwechselnd zusammen. Dies führt zu einer tetrahedralen Symmetrie in dem dodekamerischem Komplex. Die FrhB Untereinheiten berühren sich dabei praktisch nicht (0,6% der Gesamtoberfläche), sondern bilden direkt an der 3-zähligen Achse eine Pore (Abbildung 42 B, Tabelle 8). Diese Pore, mit einem Durchmesser von 10 \AA , erlaubt auch größeren Molekülen in das Dodekamer zu gelangen (Abbildung 42 B und D). Die drei FrhA Untereinheiten bilden eine große Kontaktfläche (2046 \AA^2 , entspricht 13,5% der Gesamtoberfläche) aus.

Das FrhABG Dodekamer hat die Gestalt eines hohlen Würfels mit einem Durchmesser von ca. 185 \AA (Abbildung 42 D). Der wassergefüllter Hohlraum hat einen Durchmesser von etwa 60 \AA . Der Durchmesser der Proteinschale ist auch etwa 60 \AA . Die großen FrhA Untereinheiten befinden sich hauptsächlich an der Innenseite der Proteinschale, die, wie erwartet, mit polaren Resten ausgekleidet ist (Abbildung 42 A). Die kleine FrhG Untereinheit liegt im Gegensatz dazu nur an der Außenseite des Komplexes und hält darüber hinaus die Heterotrimere zusammen. Das Eisenschwefelavoprotein FrhB liegt zu gleichen Teilen an der Außen- und Innenseite des Komplexes.

3.3.6 Katalytische Reaktionen

Der FrhABG Komplex katalysiert die Oxidation von H_2 zu H^+ und die Reduktion von F_{420} zu F_{420}H_2 . Um diese Reaktion realisieren zu können, werden die folgenden strukturellen Anforderungen an den Proteinkomplex gestellt. Wasserstoff benötigt einen Diffusionsweg durch das Proteingerüst, um von der Proteinaußenseite in das Proteininnere zum gut abgeschirmten [NiFe]-Zentrum zu gelangen, und Protonen in die umgekehrte Richtung einen polaren Weg, um nach außen zu kommen. Ferner ist ein Elektronentransfer vom aktiven [NiFe]-Zentrum zum FAD über eine Strecke von 45 \AA zu gewährleisten. Um ein Hydrid von FAD auf F_{420} zu übertragen, müssen die jeweiligen N5 und C5-Atome in Kontakt zueinander stehen. Es muss sich also eine F_{420} -Bindestelle an einer Frontseite des Isoalloxazinrings befinden. Dann kann ein Hydrid übertragen werden. Da das aktive [NiFe]-Zentrum von FrhABG denjenigen der bereits beschriebenen [NiFe]-Hydrogenasen ähnelt, ist davon auszugehen, dass auch die H_2 Bindung und Spaltung analog ablaufen. In der aktiven Form sind Nickel und Eisen nur durch zwei Cysteine verbrückt. Im inaktiven Zustand hingegen werden die Metalle des aktiven Zentrums zusätzlich durch ein Sauerstoffatom oder ein Peroxid miteinander verbunden. FrhA liegt überwiegend im reduzierten

Zustand vor. Ein kleiner Peak in der Differenzelektronendichtekarte deutet zwar auf einen geringen Anteil an oxidierten aktiven Zentren im Kristall hin, aber eine Verfeinerung als Sauerstoff war nicht möglich.

Wasserstofftransfer

H₂ gelangt bevorzugt über hydrophobe Kanäle zum aktiven [NiFe]-Zentrum. Bisher wurden vier hydrophobe Wege in den bekannten Strukturen von [NiFe]-Hydrogenasen charakterisiert (Garcin et al. 1999; Ogata et al. 2009). FrhA ist kleiner als andere große Untereinheiten. Durch das Fehlen des Verbindungsstücks zwischen der ersten und zweiten α -Helices (90:114 und 123:143) des Helixbündels entsteht ein Kanal, der gegenüber anderen potentiellen Routen deutlich bevorzugt zu sein scheint. Dies schließt jedoch nicht aus, dass H₂ zusätzlich auch über andere Wege zum aktiven [NiFe]-Zentrum gelangen kann. Der favorisierte Kanal liegt an der Kontaktfläche von FrhA und FrhG und ist ca. 20 Å lang. Die Reste γ Leu87, γ Leu75, γ Ile81 und α Phe111 bilden den Kanaleingang in das Innere des Proteins und γ Leu64, γ Thr65, γ Met62, α Ile108, α Leu112, α Val65 und α Glu14 leiten schließlich das Wasserstoffmolekül zum Nickelion (Abbildung 43). Auf diesem Weg ist kein Wassermolekül sichtbar, obwohl Platz dafür vorhanden wäre.

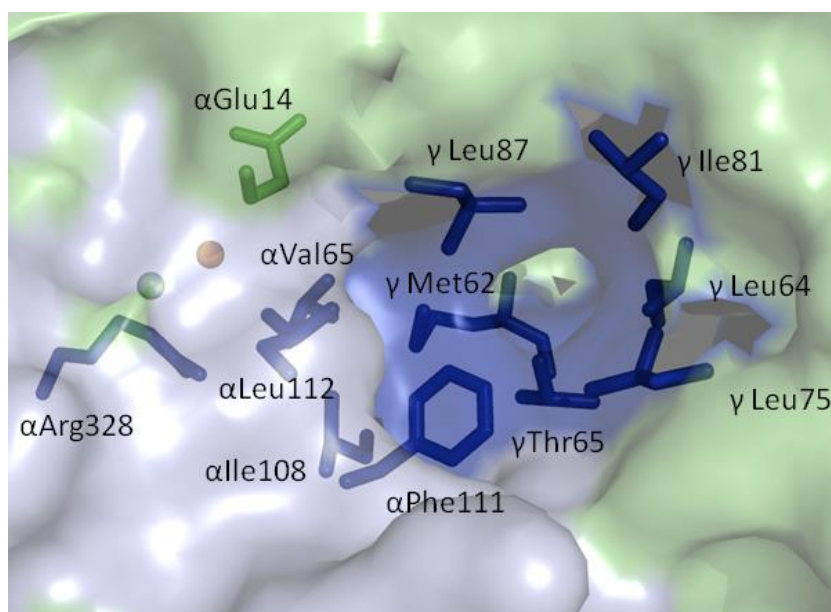


Abbildung 43: Hydrophober Kanal. Die Reste, die an der Bildung des hydrophoben Kanals beteiligt sind, sind in blau dargestellt. α Glu14 (grün) ist sowohl bei der Übertragung von H₂ auf das [NiFe]-Zentrum, als auch beim Protonentransfer beteiligt.

Protonentransfer

Eine Analyse des [NiFe]-Zentrums von FrhABG zeigte, dass einige Reste, die an den bisher postulierten Protonentransferwegen beteiligt sind, konserviert sind. So liegt das für die Aktivität äußerst wichtige Glu14 in der bekannten Konformation in direkter Nachbarschaft zu dem Nickel-ligierenden Cys380 vor. Jedoch findet man in FrhABG aufgrund von Aminosäureaustauschen auch große Unterschiede, die zu einem stark veränderten Wasserstoffbrückennetzwerk führen. So ist α Ser382 in anderen [NiFe]-Hydrogenasen meist durch ein Alanin ersetzt. An der Stelle von Glu18 liegt nun γ His53, das eine Salzbrücke zu γ Glu102 ausbildet, dessen Lokalisation interessanterweise von γ Asp60, einem Ligand des proximalen [4Fe4S]-Clusters, beeinflusst wird. Die wahrscheinlichsten Protonentransferwege gehen von α Glu14 aus und ähneln den Vorschlägen früherer struktureller Untersuchungen an [NiFe]-Hydrogenasen. Ein Weg geht dabei ausgehend von α Glu14 via γ His53 und sechs fest gebundenen Wassermolekülen (281, 245, 268, 313, 126, 146; Abbildung 44 A). Diese Wassermoleküle sind über γ His53, α Thr38, γ Leu54-O, γ Ser112, α His16, γ His111 und α Ser8 mit dem Polypeptidgerüst verankert. Die Protonen werden in einer Furche der Proteinoberfläche freigesetzt, die räumlich in der Nähe der Öffnung der FAD-Bindetasche von FrhB eines benachbarten Dimers ist (Abbildung 44 B). Ein zweiter Protonentransferweg startet ausgehend von α Glu14, via γ Thr85 und sechs Wassermoleküle, die mit γ His53, γ Gly84-N, γ Tyr52-O, α His16, γ Glu115, γ His111 und α Ser8 in Verbindung stehen (nicht gezeigt).

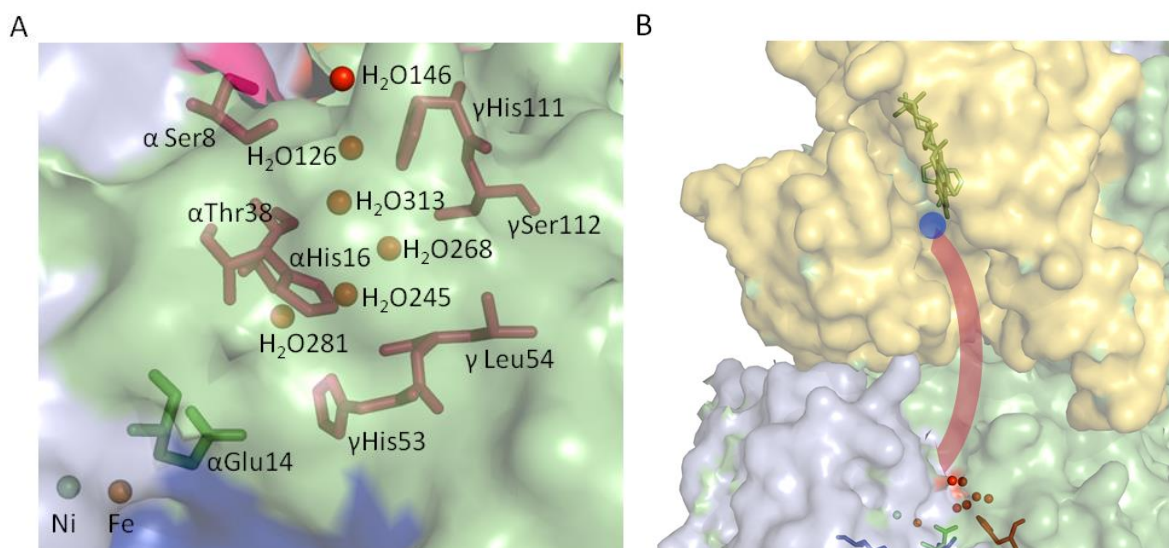


Abbildung 44: Protonentransfer in eine Furche an der Proteinoberfläche. (A) Die Reste und Wassermoleküle die am Protonentransfer beteiligt sind, sind in rot dargestellt. α Glu14 ist sowohl bei der Übertragung des H₂ auf das [NiFe]-Zentrum, als auch beim Protonentransfer beteiligt und übersichtshalber in grün dargestellt. (B) Die Protonen werden vom Inneren über Wassermoleküle und Reste (in rot dargestellt) an die Proteinoberfläche geleitet und in einer Furche freigesetzt (übersichtshalber rot unterlegt), die räumlich in der Nähe der Öffnung der FAD-Bindetasche (übersichtshalber blau unterlegt) von FrhB eines benachbarten Dimers liegt.

Elektronentransfer

Der Ort der H_2 -Oxidation und der F_{420} -Reduktion liegen 45 Å voneinander entfernt. Die zwei zu übertragenden Elektronen fließen nacheinander über vier [4Fe4S]-Clustern, die in etwa äquidistant zwischen dem [NiFe]-Zentrum auf FAD liegen (Abbildung 45). Das [NiFe]-Zentrum ist ca. 10,7 Å vom proximal gelegenen [4Fe4S]-Cluster entfernt, dieses wiederum ist 10,6 Å zum distalen, und dieses 9,6 Å zum medialen Cluster von FrhG. Der Abstand zwischen dem distalen Cluster und dem [4Fe4S]-Cluster vom FrhB beträgt 8,3 Å. Der Isoalloxazinring von FAD liegt 3,5 Å von dem letzten [4Fe4S]-Cluster entfernt. Diese Entfernungen sind kurz genug, dass der Elektronentransfer zwischen den Redoxzentren für biologische Prozesse schnell genug erfolgen kann (Marcus 1956b). Vermutlich werden die einzelnen Elektronen zwischen den Redoxzentren über Cysteine, die an die Eisen ligieren und in van-der-Waals Kontakt zueinander stehen, geleitet. Die am Elektronentransfer beteiligten Reste von FrhABG und den anderen [NiFe]-Hydrogenasen liegt nur bis zum proximalen Cluster von FrhG konserviert vor (Abbildung 37). Dies hebt die zentrale und äußerst wichtige Rolle des proximalen Clusters und gleichzeitig der N-terminalen Domäne von FrhG für den katalytischen Prozess am [NiFe]-Zentrum hervor. Zu erwähnen sei an dieser Stelle nochmals, dass dieses Cluster in FrhABG von einem γ Asp60, anstelle eines konservierten Cys ligiert wird.

Das mediale und distale Cluster von FrhG liegen, relativ zum proximalen Cluster, leicht verdreht vor. Dies spiegelt sich in einer relativen Versetzung des medialen Clusters um 7,5 Å und des distalen Clusters um 10 Å wieder (Abbildung 36). Die FeS-Cluster sind dabei um ca. 60° gedreht, so dass zwei Eisen eines jeden Clusters den kürzesten Abstand zueinander einnehmen (Abbildung 45). Das Proteingerüst in diesem Teil entspricht nicht dem bereits bekannter [NiFe]-Hydrogenase Strukturen.

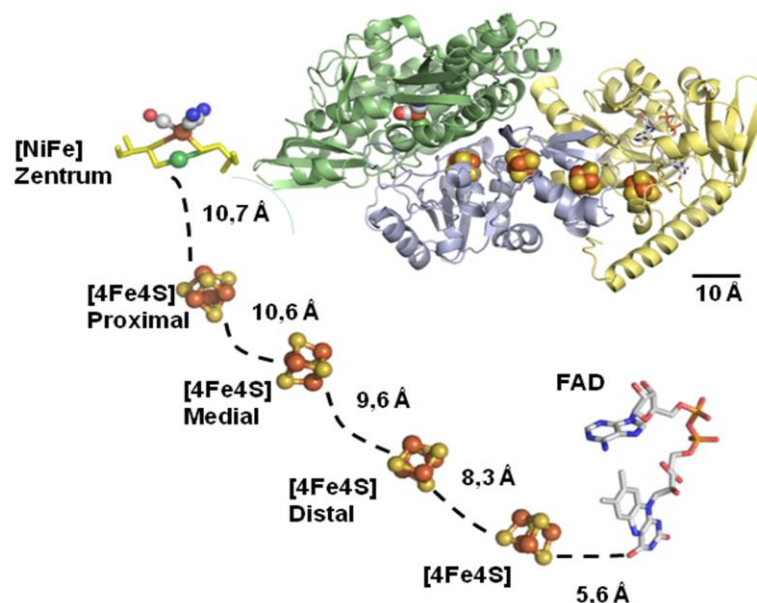


Abbildung 45: Elektronentransfer. Elektronentransfer vom [NiFe]-Zentrum über die [4Fe4S]-Cluster zu FAD. Gleichzeitig werden die Abstände in Å angegeben. Die Untereinheit FrhA ist in blau, FrhB in gelb und FrhG in grün dargestellt.

Im Abstand von ca. 5,8 Å und 8,6 Å Entfernung vom medialen Cluster liegen zwei weitere Cysteine (γ_1 Cys206 und γ_1 Cys208) direkt an der Grenze zu FrhG des Nachbarheterotrimer. Die genannten Cysteine liegen in der Nähe der zweizähligen Achse und sind 5,1 Å von dem äquivalenten Cysteinen des Nachbarheterotrimer entfernt. Eine ausgeprägte zusätzliche Elektronendichte, die auf ein Metall schließen läßt, wurde nur bei einem Datensatz erhalten.

F₄₂₀-Bindung und Hydridtransfer

FAD ist ein Ein- und Zwei-Elektronendonator/akzeptor, während F₄₂₀ wie NAD(P) ausschließlich ein Hydriddonor/akzeptor ist. Das heißt, dass FAD zweimal ein Elektron über die Kette der FeS-Zentren aufnimmt und dies als Hydrid auf das Coenzym F₄₂₀ überträgt. Die Übertragung erfolgt über die pro-S-Position des F₄₂₀ und setzt voraus, dass das N5-Atom von FAD und das C5-Atom von F₄₂₀ in van-der-Waals Kontakt zueinander stehen. Zwar konnte keine Röntgenstruktur eines FrhABG-F₄₂₀-Komplexes bestimmt werden, doch war es aufgrund dieser Vorgaben möglich, F₄₂₀ in die Substrattasche von FrhB zu modellieren (siehe Abschnitt 3.3.4; Abbildung 46). Dabei wurde das Substrat nicht an die gleiche Position modelliert, in der bei dem Cryo-EM Modell potentielle Elektronendichte für F₄₂₀ interpretiert wurde. Denn die Kristallstruktur weist an dieser Position Elektronendichten für Seitenketten auf. In der Kristallstruktur sorgt Pro57 für genügend Raum, um das F₄₂₀ neben dem FAD zu positionieren. Ribitol, Pyrophosphat und Polyglutamat liegen entlang der Öffnung der Substrattasche.

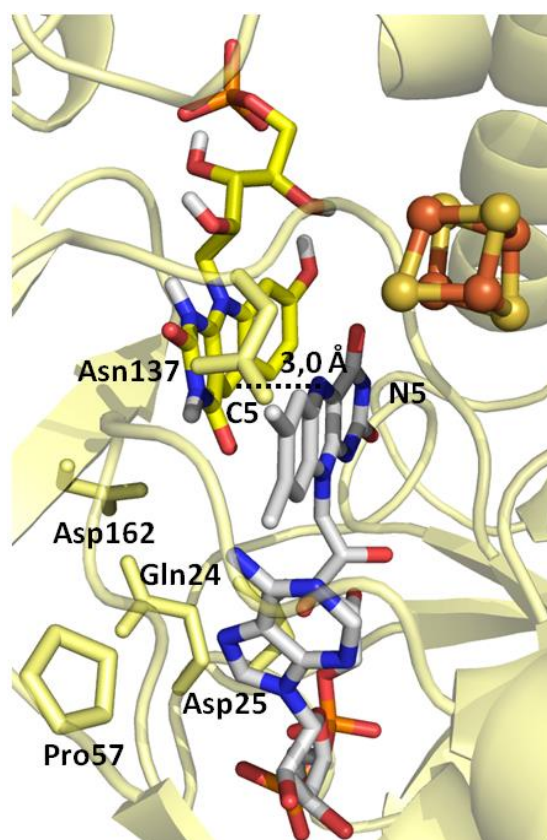


Abbildung 46: Substrattasche von FrhB. Die potentielle F₄₂₀-Bindestelle befindet sich in einer Tasche von FrhB in van-der-Waals Kontakt zu FAD. Das C5 des modellierten F₄₂₀ (in gelb dargestellt) liegt 3,0 Å von N5 des FAD (in weiß dargestellt) entfernt. Das Ribitol, sowie das Pyrophosphat und das Polyglutamat von F₄₂₀ sind zur Öffnung der Substrattasche hin orientiert. Das [4Fe4S]-Cluster ist in gelb/orange dargestellt.

Der Pyrimidinteil des Isoalloxazinrings wechselwirkt mit Asn137, der Hydroxybenzylring, der in Richtung Substrattasche orientiert ist wechselwirkt mit den hydrophoben Resten Ile163, Val210 und Leu257. Das modellierte F_{420} kollidiert mit den Seitenketten der beiden Resten Tyr76 und Glu136. Dies deutet darauf hin, dass diese Reste ihre Konformation bei Bindung von F_{420} ändern. Tyr76 könnte zusammen mit Ile163 die pro-R-Seite des F_{420} abdecken und Glu136 könnte mit dem Ribitol wechselwirken. His185, Lys264, und andere Reste der charakteristischen C-terminalen Helix könnten die negative Ladung der Phosphatgruppe von F_{420} kompensieren. Zwei Aspartate (Asp25, Asp162) und ein Glutamin (Gln24) in nächster Nähe zu FAD und F_{420} könnte beim Hydridtransfer eine wichtige katalytische Rolle zukommen, indem sie Einfluss auf das Redoxpotential nehmen bzw. Protonen für die Reduktion von FAD zur Verfügung stellen.

Zwei FrhB Untereinheiten aus benachbarten Dimeren kommen in der Nähe der dreizähligen Achse zusammen, ohne sich zu berühren. Eine Interaktion aufgrund von strukturellen Veränderungen als Folge der F_{420} -Bindung wäre möglich, wurde aber in der Cryo-EM Struktur von FrhABG, im Komplex mit F_{420} , nicht gefunden. FrhB ist fest assoziiert mit dem Partnertrimer. Wechselwirkungen wurden zwischen β His185O und α Lys243-NZ, bzw. zwischen β Tyr187-OG und β Glu232-OE2 gefunden. FrhB ist auch in Kontakt zu FrhA eines Nachbardimers; so findet man Wasserstoffbrücken zwischen β Glu156-OE1 und α Arg166-NH2 und zwischen β Cys149-O und β Lys177-NZ. Trotzdem ist ein Informationsaustausch zwischen dem [NiFe]-Zentrum und FAD über 45 Å unwahrscheinlich.

3.4 FrhB als F₄₂₀-bindende Untereinheit

Die Kristallstruktur des FrhABG Komplexes konnte gelöst werden, aber es wurde bisher noch keine Elektronendichte des Substrats F₄₂₀ gezeigt. Durch genaue Strukturanalysen und Überlegungen, die den reversiblen Hydridtransfer von FAD zum Substrat betreffen, wurde F₄₂₀ nachträglich im van-der-Waals Kontakt zum FAD in die FrhB Untereinheit modelliert. In dem Cryo-EM Modell wurde F₄₂₀ ausschließlich in der Elektronendichte von FrhABG mit zusätzlich gebundenem F₄₂₀ dargestellt. Die potentielle Elektronendichte des F₄₂₀ liegt hier ebenfalls in direkter Nachbarschaft zum FAD. Als eindeutiger Beweis, dass es sich bei FrhB tatsächlich um die F₄₂₀-bindende Untereinheit handelt, wurde diese aktiv in *E. coli* produziert. Vor den Aktivitätsmessungen wurde die Menge an Eisen bestimmt und gebundenes FAD im UV/Vis Spektrum nachgewiesen. Eine F₄₂₀-oxidierende Aktivität von FrhB wurde mit Benzylviologen (BV) als Elektronenakzeptor gemessen. Die maximale spezifische Aktivität von FrhB lag bei 12 U/mg und ist damit ähnlich zu der Aktivität der ebenfalls heterolog produzierten F-Untereinheit des F₄₂₀H₂:Phenazin-Oxidoreduktase (Fqo) Komplexes aus *A. fulgidus*. Da die Bedingungen des Enzymtests und das heterolog produzierte Protein nicht stabil genug waren, wurde keine umfassendere biochemische Charakterisierung von FrhB, abgesehen von Redoxitationen, vorgenommen.

3.4.1 Heterologe Produktion und Aufreinigung von FrhB

Nach erfolgreicher Transformation von *frhB* aus *M. jannaschii* in *E. coli* wurde die Proteinexpression mit 0,5 mM IPTG induziert. Um zu gewährleisten, dass genug freies Eisen vorhanden ist um das [4Fe4S]-Cluster zu bilden, wurde das Medium mit unterschiedlichen Eisenquellen supplementiert. Die anaerobe Aufreinigung erfolgte in Anwesenheit von FAD an Ni-NTA, da FrhB ein C-terminaler His-Tag angehängt wurde. Aus 5 g Feuchtzellen wurden ca. 100 mg FrhB isoliert (Abbildung 47).

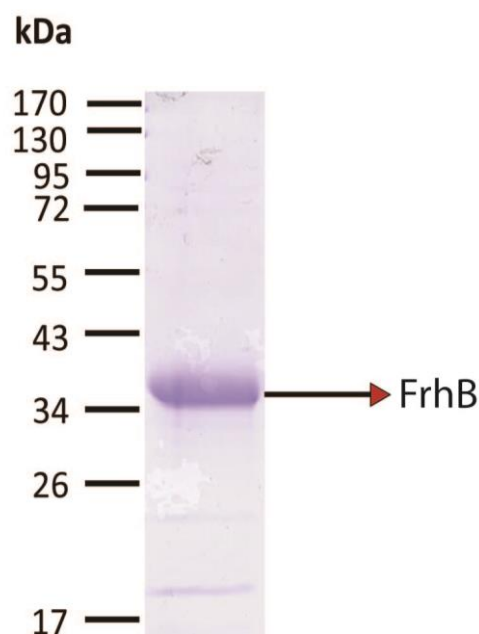


Abbildung 47: Aufreinigung von FrhB. Heterolog produziertes FrhB nach erfolgreicher Aufreinigung, visualisiert mit SDS-PAGE (Molekularer Massen Standard „Prestained“, Fermentas) und analysiert mit MALDI-TOF MS.

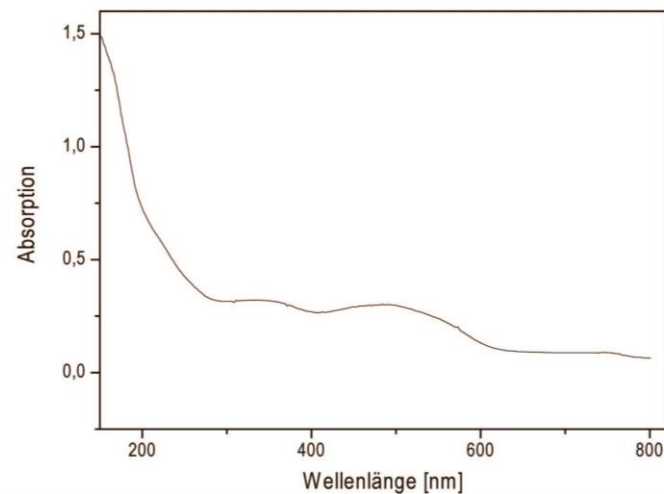


Abbildung 48: UV/Vis Spektrum von FrhB. UV/Vis Spektrum von aufgereinigtem rekombinanten FrhB nach *in vivo* FeS-Cluster Rekonstitution. Die Probe enthielt 40 μ M FrhB in 50 mM Tris-HCl (pH 7,6).

Eine Bestimmung der Eisenkonzentration des gereinigten Proteins ergab 4-6 Fe pro mol FrhB. Diese Konzentration entspricht in etwa der erwarteten für ein [4Fe4S]-Cluster. Da der Aufreinigungspuffer immer FAD enthielt, war eine genaue Konzentrationsbestimmung von diesem Cofaktor nicht möglich. Proteingebundenes FAD wurde im UV/Vis Spektrum durch die zwei Maxima um 350 nm und 480 nm (Abbildung 48) nachgewiesen, da diese Maxima charakteristisch für oxidiertes FAD sind. FrhB konnte nicht über einen längeren Zeitraum hinweg stabilisiert werden, sondern aggregierte über Nacht und war damit inaktiv. Außerdem war es nicht möglich diese Untereinheit einzufrieren, denn das Protein neigte beim Auftauprozess ebenfalls zur Aggregatbildung.

3.4.2 F₄₂₀-oxidierende Aktivität und katalytische Eigenschaften von FrhB

Die F₄₂₀-oxidierende Aktivität von FrhB wurde mit einem anaeroben Enzymtest gemessen, indem die Reduktion des Elektronenakzeptors BV photometrisch beobachtet wurde. Zuvor jedoch musste reduziertes F₄₂₀H₂ in der Küvette bereitgestellt werden. Dies war nur mit einer vorgeschalteten Reaktion, mit dem Enzym Methylen-H₄MPT-Dehydrogenase (Mtd), möglich (Abbildung 49). Dabei wurde in einer Redoxreaktion F₄₂₀ reduziert und gleichzeitig CH₂-H₄MPT oxidiert. F₄₂₀ kann unter anderem auch mit Na-Dithionit reduziert werden. Jedoch reduziert dieses ebenfalls BV, wenn es nicht vollständig mit Sauerstoff entfernt wird. Die ausreichende Zufuhr von Sauerstoff führte in diesem Fall aber zu einer unzureichend reduzierten Bedingung in der Küvette, obwohl diese anschließend ausgiebig mit Stickstoff gespült wurde.

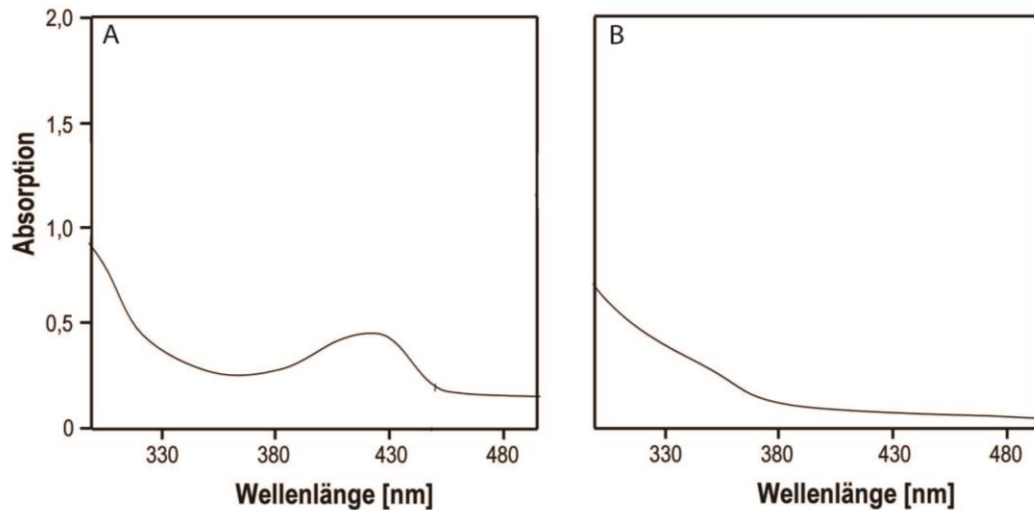


Abbildung 49: UV/Vis Spektrum der vorgeschalteten Reaktion. (A) Gezeigt ist hier die Bedingung in der Küvette mit $\text{CH}_2\text{-H}_4\text{MPT}$ und F_{420} ohne Mtd und (B) nach Reaktion mit Mtd. Die Assays wurden bei 30°C in anaeroben 1,5 ml Küvetten durchgeführt, die 100% N_2 in der Gasphase enthielten. Der anaerobe Testansatz enthielt des Weiteren 0,68 ml 100 KPP-Puffer pH 7,0, $30 \mu\text{M}$ F_{420} , $35 \mu\text{M}$ $\text{CH}_2\text{-H}_4\text{MPT}$ (A). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 30 U/mg Mtd gestartet (B).

Für genaue Aktivitätsmessungen war die tatsächlich vorliegende Konzentration von F_{420}H_2 in der Küvette ausschlaggebend. Im UV/Vis Spektrum wurde vor Reaktionsstart der vorgeschalteten Reaktion, oxidiertes F_{420} photometrisch dargestellt (Abbildung 49 A) und nach der Reaktion mit Mtd überprüft, dass der charakteristische Peak des oxidierten F_{420} nicht mehr vorhanden war (Abbildung 49 B). Nach Zugabe von BV kam es nach einer längeren Inkubation zur Autoreduktion dieses Elektronenakzeptors, jedoch verlief die FrhB-Reaktion wesentlich schneller, so dass die Autoreduktion vernachlässigbar war.

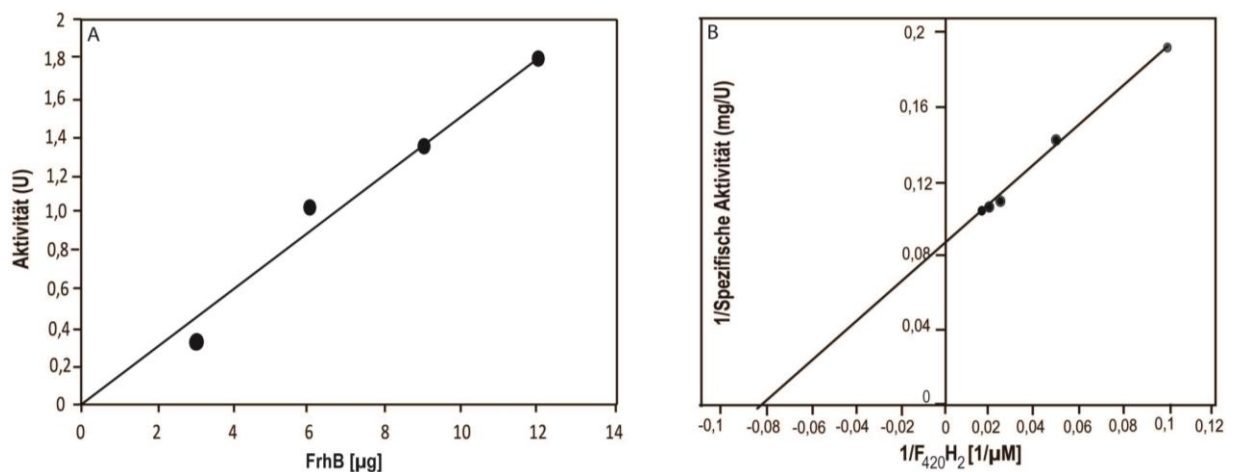


Abbildung 50: Kinetische Eigenschaften von FrhB. (A) Abhängigkeit der F_{420} -oxidierenden Aktivität und (B) Lineweaver-Burk Auftragung der F_{420}H_2 -abhängigen Oxidation mit BV gegen die Konzentration von F_{420}H_2 . Die Assays wurden bei 30°C in anaeroben 1,5 ml Küvetten durchgeführt, die 100% N_2 in der Gasphase enthielten. Der anaerobe Testansatz enthielt des Weiteren 0,68 ml KPP-Puffer pH 7,0 und wenn nicht anders angegeben: $30 \mu\text{M}$ F_{420} bzw. $35 \mu\text{M}$ $\text{CH}_2\text{-H}_4\text{MPT}$. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms (1-12 µg) gestartet. Die Reduktion von BV_{ox} zu BV_{red} durch FrhB wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt.

Für die spezifische F_{420} -oxidierende Aktivität von FrhB liegt der V_{\max} bei 12 U/mg (Abbildung 50). Bei einer Substratkonzentration von ca. $12,5 \mu\text{M } F_{420}\text{H}_2$ liegt die halbmaximale Geschwindigkeit der Reaktion vor (Abbildung 50 B). Jedoch war es nicht möglich, diese K_m -Messungen eindeutig reproduzierbar zu wiederholen, da der Enzymtest nicht in einem stabilen Gleichgewicht eingestellt werden konnte. So ist der angegebene K_m -Wert als Richtwert zu verstehen. In einer früheren Arbeit in der FqoF aktiv heterolog produziert wurde, erfolgte ebenfalls keine kinetische Charakterisierung dieser Untereinheit (Bruggemann et al. 2000; Hoffmann 2003). Wie im Fall von FqoF wurde nun aber eindeutig durch die heterologe Produktion der aktiven FrhB Untereinheit gezeigt, dass diese tatsächlich die F_{420} -bindende Untereinheit ist.

Das Redoxpotential für das $[4\text{Fe}4\text{S}]$ -Cluster von FrhB wurde durch Redox titrationen in Gegenwart von Mediatoren durchgeführt und mittels ESR-Spektroskopie verfolgt. Dabei wurde ein Spektrum von +3 bis -455 mV abgedeckt. Eine Mittelpunktbestimmung war aufgrund des sehr negativen Redoxpotentials nicht möglich. Die ersten ESR-Signale wurden bei Werten unter -450 mV detektiert (Abbildung 51). Das rhombische Signal weist $g_z = 1,941$ und $g_y = 1,89$ auf.

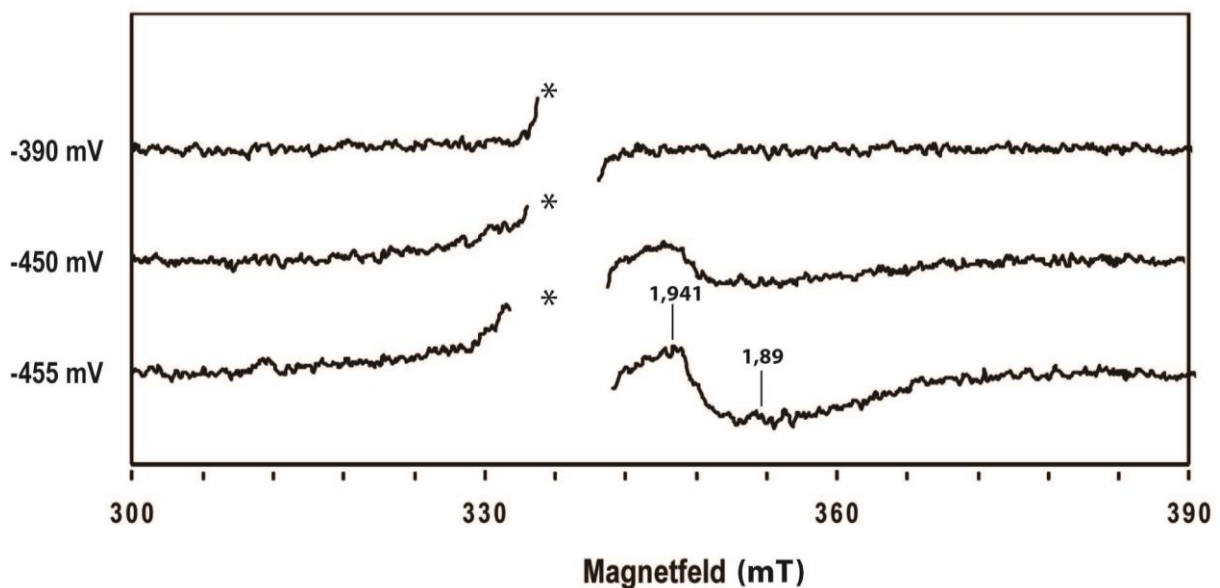


Abbildung 51: Redoxverhalten von FrhB, verfolgt mittels ESR-Spektroskopie. Unter anaeroben Bedingungen wurden 2 ml einer $40 \mu\text{M}$ FrhB Lösung (in 50 mM Tris/HCl pH 7,6) sukzessive mit Na-Dithionit reduziert. Die ESR-Spektren, jeweils die Summe aus zwei Spektren, wurden unter folgenden Bedingungen aufgenommen: Temperatur von 11 K, Mikrowellenleistung von 2 mW, einer Modulations-Amplitude von $1,25 \text{ mT}$, einer Modulationsfrequenz von 100 kHz und eine Frequenz von 9,460 GHz. * Radikalspezies ($g = 2,004$) welche wahrscheinlich die radikalische Form von MV oder BV darstellt, wurde aufgrund der Übersichtlichkeit entfernt.

4 Diskussion

FrhABG ist die quantitativ wichtigste Hydrogenase in Methanogenen, da sie über reduziertes $F_{420}H_2$ vier der acht zur CO_2 Reduktion benötigten Elektronen in der Methanogenese bereitstellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde FrhABG von *M. marburgensis* bis zur Homogenität aufgereinigt, strukturell charakterisiert und FrhB als F_{420} -bindende Untereinheit identifiziert. Neben der Symmetrie spielt der Erfolg der Aufreinigung bis zur Homogenität und dabei vor allem die Verwendung von CHAPS eine wichtige Rolle für die Strukturlösung von FrhABG. Für die Einzelpartikel Cryo-EM scheint FrhABG ein eher unsymmetrischer Komplex zu sein, wenn man die Struktur mit den unterschiedlichen Sekundärstrukturelementen mit anderen bekannten Strukturen, wie der hochaufgelösten Virushülle des Tabakvirus (Ge und Zhou 2011) oder die Chaperone GroEL (Ludtke et al. 2008) und Mm-cpn (Zhang et al. 2010), vergleicht. In der Röntgenstrukturanalyse stellt der makromolekulare Komplex FrhABG mit einer solch hohen Auflösung ein eher seltenes Beispiel dar (Dutta und Berman 2005). Ein Vergleich der beiden mit unterschiedlichen Methoden ermittelten FrhABG Strukturen ist schwer möglich, da dafür die Auflösungsgrenzen der beiden Methoden mit 1,8 Å und ~4 Å zu weit voneinander entfernt liegen. Dennoch zeigen beide Strukturen einen makromolekularen Komplex aus 12 Heterotrimeren mit einem proteinleeren Raum im Inneren. Die Funktion des Innenraums von FrhABG und die Assemblierung des Komplexes sind nicht bekannt, aber durch verwandte Beispiele, wie durch die Schwefeloxid-Reduktase (SOR, (Urich et al. 2004)) und Baccoferritin (Bfr, (Dautant et al. 1998)) können Hypothesen dazu aufgestellt werden. Möglicherweise speichert der Komplex in den hydrophoben Kanälen Wasserstoff, wie es bereits für andere [NiFe]-Hydrogenasen beschrieben wurde (Teixeira et al. 2006). Von großem Nutzen könnte diese Speicherung bei der methylotroph Methanogenese und Wachstum auf Formiat sein. Einige Aminosäureaustausche in FrhABG erweitern unser Wissen über [NiFe]-Hydrogenasen und könnten der Feineinstellung dienen. FrhB ist ein strukturell neu charakterisiertes Enzym, in das F_{420} modelliert wurde.

Aufreinigung von FrhABG

In den vergangenen 30 Jahren wurde FrhABG immer wieder aerob aufgereinigt (Baron und Ferry 1989a; Fiebig und Friedrich 1989; Fox et al. 1987; Muth et al. 1987a) und biochemisch charakterisiert (Bingemann und Klein 2000a; Kojima et al. 1983; Michel et al. 1995b; Vaupel und Thauer 1998). Eine aerobe Aufreinigung wurde in der Vergangenheit oft der Aufreinigung unter Ausschluss von Sauerstoff vorgezogen, da diese leichter zu handhaben war und eine, wenn auch geringe F_{420} -reduzierende Aktivität zu messen war. Eine beschriebene anaerobe Aufreinigung (Sorgenfrei et al. 1997a) der F_{420} -reduzierenden [NiFeSe]-Hydrogenase aus *M. voltae* an S160, DEAE-Sepharose, Phenyl-Superose und MonoQ konnte nicht reproduziert werden. So wurde am Anfang dieser Arbeit erneut eine Aufreinigung von FrhABG, unter Ausschluss von Sauerstoff etabliert. Diese stellt einen ausschlaggebenden Punkt für den Erfolg der strukturellen Aufklärung dar. Maßgeblich zum Erfolg der etablierten Aufreinigung trug die Verwendung von Na-Dithionit, die Inkubation mit CHAPS und ein zweiter chromatographischer Schritt an Sephacryl S-400 bei. Nur so wurde der FrhABG Komplex ohne störende kleinere Proteine, ATPase ähnliche Komplexe oder Aggregate mit anderen FrhABG Komplexen erhalten. Möglicherweise trennten die

Chemikalien Aggregate von FrhABG, die dann aufgrund unterschiedlicher molekularer Massen durch Sephacryl S-400 separiert wurden. Eine zeitlich schnelle Präparation, innerhalb von zwei Tagen, war eine weitere Voraussetzung, um eine erneute Aggregation der FrhABG Komplexe zu vermeiden.

Einzelpartikel Cryo-EM Modell von FrhABG

In der Vergangenheit wurde FrhABG bereits mittels *negative stained* EM (Braks et al. 1994; Lunsdorf et al. 1991; Wackett et al. 1987b) strukturell beschrieben. Aber bisher wurde keine hoch aufgelöste Struktur präsentiert, die Aussagen über den molekularen Aufbau dieses Enzyms zulassen würde. In dieser Arbeit konnte die Struktur des FrhABG Komplexes durch Cryo-EM mit einer Auflösung von ~ 4 Å erfolgreich gelöst werden. Diese Auflösungsgrenze war überraschend und ist einzigartig, da FrhABG für die Cryo-EM ein eher unsymmetrisches Protein ist, im Vergleich zu anderen bereits hochaufgelösten Strukturen. Diese Komplexe setzen sich nämlich aus einer sich wiederholenden symmetrischen Untereinheit zusammen, die kaum mehr als ein Sekundärstrukturelement aufweist. Dagegen stellt ein FrhABG Heterotrimer eine eher unsymmetrische Einheit mit allen bekannten Sekundärstrukturelementen dar. Jedoch wiederholt sich dieses Heterotrimer in einer symmetrischen tetrahedralen Anordnung, wodurch es zu keiner bevorzugten Orientierung des Komplexes kommt.

Lange war nicht bekannt, aus wie vielen Untereinheiten bzw. Heterotrimeren sich der FrhABG Komplex tatsächlich zusammensetzt. Das Vorhandensein von zwei aktiven Formen unterschiedlicher molekularer Massen wurde diskutiert. Die kleinere Form wurde als ein Heterotrimer oder als Dimer beschrieben und die größere Form als ein makromolekularer Komplex aus sieben bis neun Heterotrimeren (Muth et al. 1987a; Baron und Ferry 1989a; Fiebig und Friedrich 1989; Lunsdorf et al. 1991). Frühere elektronenmikroskopische Aufnahmen von FrhABG aus *M. thermoautotrophicus* (Wackett et al. 1987a) und den mesophilen Archaeen *Methanococcus voltae* (Muth et al. 1987b) und *Methanospirillum hungatei* (Sprott et al. 1987) zeigten ebenfalls einen großen Komplex. Aber erst durch das in dieser Arbeit erstellte Cryo-EM Modell wurde das erste Mal eindeutig geklärt, dass der FrhABG Komplex aus 12 Heterotrimeren besteht. So liegt ein FrhABG Heterotrimer spiegelverkehrt zu einem anderen Heterotrimer, die zusammen ein Dimer bilden. Insgesamt kommt dieses Dimer sechs Mal im FrhABG Komplex vor. Die Metallzentren von FrhG und FrhA trugen wesentlich dazu bei, dass die strukturell bekannten und ähnlichen Untereinheiten einer Gruppe 1 [NiFe]-Hydrogenase in die erzeugte Elektronendichte gelegt werden konnten, um so den Modellbau zu vereinfachen. Die erzielte Auflösungsgrenze war sogar ausreichend, um das Kohlenstoffrückrad der strukturell bis dahin noch nicht beschriebenen FrhB Untereinheit *de novo* in die Elektronendichte anzupassen. Auch wurde im FrhABG Modell Elektronendichte für FAD und das Substrat F₄₂₀ gezeigt.

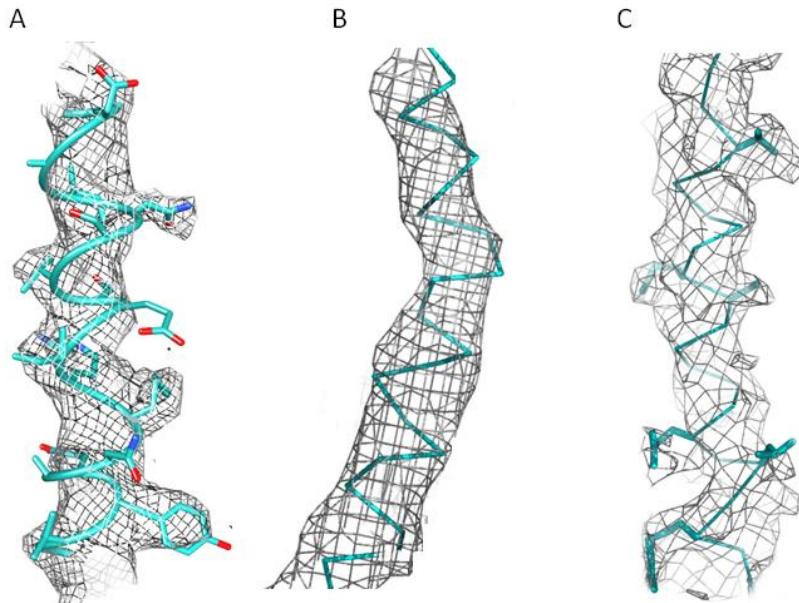


Abbildung 52: Cryo-EM Elektronendichten von FrhABG, GroEL und Mm-cpn. Eine Gegenüberstellung der Elektronendichten von FrhABG (A), GroEL (B, PDB-Code: 3cau) und Mm-cpn (C, PDB-Code: 3los) zeigt einen direkten Vergleich der Auflösungsgrenzen von ~ 4 Å, 4,2 Å bzw. 4,3 Å. GroEL und Mm-cpn weisen nur α -Helices als Sekundärelemente auf, im Gegensatz zu FrhABG.

Bisher wurden nur sehr symmetrische Strukturen zu höheren oder vergleichbaren Auflösungsgrenzen wie die des FrhABG Modells mit Cryo-EM gelöst. Die Oberfläche der Virushülle des Tabakmosaikvirus konnte mit einer Auflösungsgrenze von 2,8 Å dargestellt werden (Ge und Zhou 2011). Dieser Virus erreicht dabei eine Länge von 300 Å und hat einen Durchmesser von 180 Å. Charakteristisch für diese Oberfläche sind sich immer wiederholende α -Helices und Bereiche ohne Sekundärstrukturelemente. Die Chaperone GroEL (PDB-Code: 3cau, (Ludtke et al. 2008)) und Mm-cpn (PDB-Code: 3los (Zhang et al. 2010)) haben Elektronendichten von 4,2 Å bzw. 4,3 Å. GroEL ist ein Chaperon der Gruppe 1 und hat eine molekulare Masse von 840 kDa. GroEL setzt sich aus 14 Monomeren (60 kDa) zusammen, die in einer ringähnlichen Struktur angeordnet sind. In der hinterlegten Elektronendichte für GroEL sind aber keine Seitenketten sichtbar (Abbildung 52 B), obwohl diese in der Originalpublikation erwähnt werden (Ge und Zhou 2011). Zum Zeitpunkt des Modellbaus lagen bereits einige Kristallstrukturen des Komplexes vor (u.a. PDB-Code: 1j4z, 2,4 Å (Boisvert et al. 1996)). Die Struktur von Mm-cpn wurde *de novo* modelliert. Mm-cpn gehört zu den Chaperonen der Gruppe 2 und wurde aus *Methanococcus maripaludis* isoliert. Dabei besteht dieser 2600 kDa Komplex aus 16 Monomeren (163 kDa). Eine Gemeinsamkeit beider Chaperone ist, dass sie nur α -Helices als einziges Sekundärstrukturelement haben und gänzlich ohne Metallzentren auskommen. Die Qualität der Elektronendichten dieser beiden Chaperone ist schwer untereinander, oder mit der Elektronendichte von FrhABG vergleichbar (Abbildung 52). Dies liegt wohl auch daran, dass es bisher unterschiedliche Methoden gibt, die Auflösung in der Cryo-EM zu ermitteln. Zudem stehen andere Parameter als bei der Kristallographie zur Verfügung. Prinzipiell wird die Auflösungsgrenze der Cryo-EM mit zwei

unterschiedlichen Faktoren angegeben (Scheres und Chen 2012), die aus zwei unabhängigen Datensätzen gemittelt werden. Der kritische Faktor spiegelt dabei eher die Auflösungsgrenze einer Kristallstruktur wider. Aus diesem Grund wird häufiger dieser Wert und nicht der optimistischere verwendet, der wesentlich höher liegt. Bei der Cryo-EM ist es wichtig, eine Überinterpretation der Elektronendichte zu vermeiden. Nur so wird kein Rauschen durch eine falsche Auswertung als Dichte für Seitenketten interpretiert (Scheres und Chen 2012).

Kristallstruktur von FrhABG

Um die Kristallstruktur von FrhABG mit der für Makromoleküle sehr hohen Auflösung von 1,8 Å zu generieren, wurden über 1000 verschiedene anaerobe Kristallisationsbedingungen getestet. Unter vielen Bedingungen konnte ein Kristallwachstum beobachtet werden, aber erst die Verwendung eines Kristallisationsscreens mit Pentaerythritol brachte die Strukturaufklärung von FrhABG mittels Röntgenstrukturanalyse maßgeblich voran. Die Kristallstruktur von FrhABG zeigte, wie schon das Cryo-EM Modell, dass FrhABG als makromolekularer Komplex aus 12 Heterotrimeren mit einer molekularen Masse von 1250 kDa vorliegt. Immer noch sind Kristallstrukturen von makromolekularen Komplexen (>500 kDa) eher selten (Dutta und Berman 2005). Sie machen nur ca. 2% aller Strukturen in Datenbanken aus, wobei 20% der Strukturen nicht durch Röntgenstrukturanalyse, sondern durch Cryo-EM bestimmt wurden. Virusstrukturen machen den größten Anteil der gelösten makromolekularen Strukturen aus. FrhABG gehört mit einer molekularen Masse von 1250 kDa, einem Durchmesser von 185 Å und einem Volumen von 3315 nm³ auch bei den makromolekularen Komplexen zu den wenigen Beispielen, bei denen eine hohe Auflösung (>3,0 Å) erreicht wurde. Dies ist nicht zuletzt der Symmetrie des Komplexes zu verdanken, die sich in der Raumgruppe F₂₃ widerspiegelt.

Zwei weitere Proteine mit ähnlich hoher symmetrischer Architektur, aber mit unterschiedlichen Volumina und molekularen Massen, wurden bisher charakterisiert. Dazu zählt die Schwefeloxid-Reduktase (SOR, Urich et al. 2006, PDB-Code: 2cb2, 1,7 Å) von *Acidianus ambivalens*, die einen globulären Komplex mit einer molekularen Masse von 871 kDa bildet. Der Komplex, der die sauerstoffabhängige Disproportionierung von elementarem Schwefel katalysiert, setzt sich aus 24 Monomeren (36,3 kDa) zusammen. Dabei hat der Komplex einen Durchmesser von 150 Å und ein Volumen von 1767 nm³. Das zweite Enzym ist das weitaus kleinere Eisen-speichernde Bacterioferritin (Bfr, PDB-Code: 1bfr, 2,94 Å) mit einer molekularen Masse von 450 kDa und einem Volumen von 696 nm³, bestehend aus 24 gleichen Untereinheiten (18,2 kDa) und einem Durchmesser von 110 Å (Dautant et al. 1998). Charakteristisch für die Bfr-Monomere ist ein Vier-Helix-Bündel, gleichzeitig enthält die Sekundärstruktur keine β -Faltblätter oder Loops.

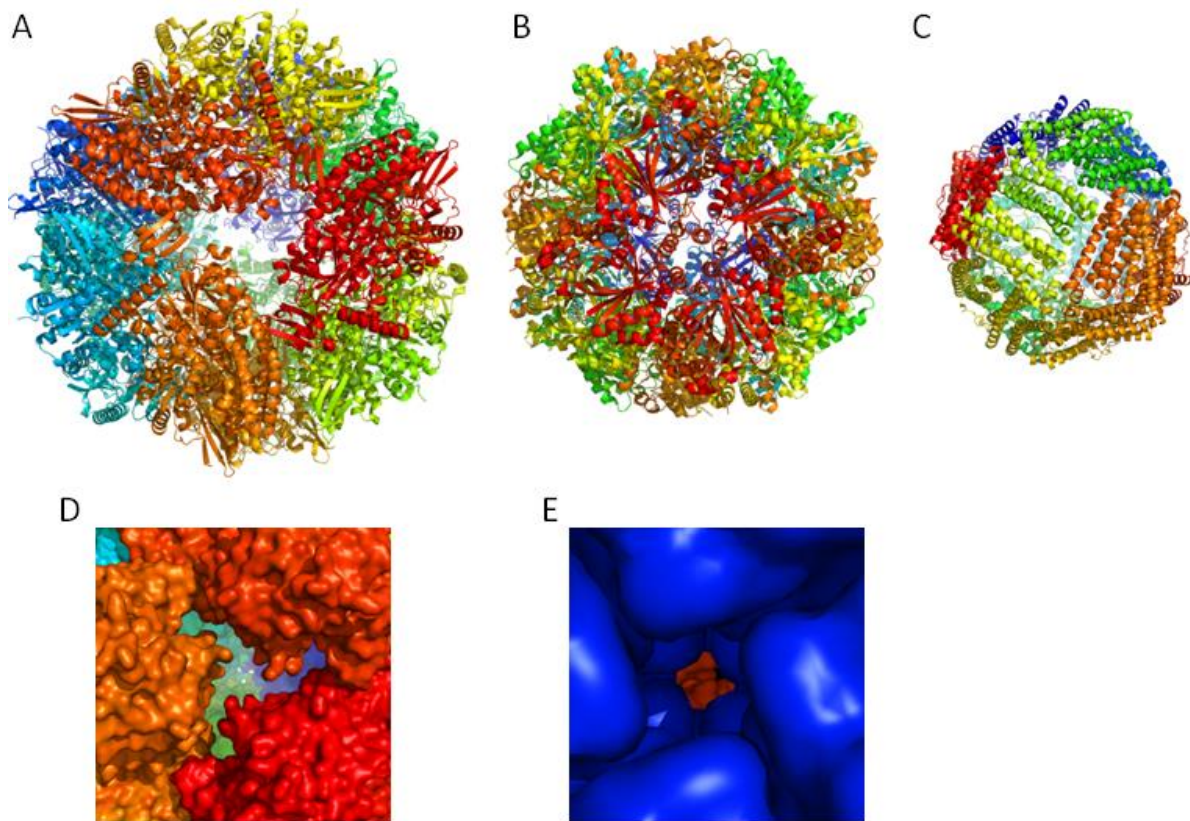


Abbildung 53: Kristallstruktur von FrhABG, SOR und Bfr. Ein Vergleich der Komplexe FrhABG (A), SOR (B, PDB-Code: 2cb2, 1,7 Å) und Bfr (C, PDB-Code: 1bfr, 2,94 Å) zeigt, dass FrhABG den größten Durchmesser aufweist. Die drei Komplexe (dargestellt in Regenbogenfarben von rot zu blau, wobei jede Untereinheit eine andere Farbe hat) haben alle ein Solvent-gefüllten Innenraum. Bei FrhABG (D) und SOR (E) führen Poren in das Innere.

Eine Gemeinsamkeit dieser drei Komplexe sind Solvent-gefüllte Hohlräume im Inneren der Komplexe; bei SOR und FrhABG führen dabei gegenüberliegende Poren ins Innere (Abbildung 53). Der Durchmesser und das Volumen der Innenräume variieren (FrhABG: 60 Å, 110 nm³; SOR: 110 Å, 520 nm³; Bfr: 90 Å, 380 nm³). Bfr ist am Eisen-Metabolismus beteiligt und formt eine Reaktionskammer, um dort Eisen zu speichern und somit den Organismus zu schützen, denn Eisen reagiert in Anwesenheit von Sauerstoff zu einem toxischen Hydroxylradikal (Harrison und Arosio 1996). Dieselbe Funktion, also die Speicherung, kann auch für SOR angenommen werden, denn die aktiven Zentren der Monomere liegen im Inneren des Komplexes und sind von der Oberfläche nicht zugänglich. Es wurden sechs mögliche Poren mit einem Durchmesser von 8,5 Å ausgemacht, die durch die hydrophobe, apolare Oberfläche gleichzeitig einen Filter darstellen und selektiv nur das lineare Polysulfid passieren lassen (Urich et al. 2006). Der Vorteil des Speicherns von Substrat besteht in der Bildung eines Reaktionsraums, indem andere Bedingungen herrschen, wie in der abgeschirmten cytoplasmatischen Umgebung. Gleichzeitig wird so das Problem der Diffusion über die Cytoplasmamembran umgangen. Ob im Inneren von FrhABG ebenfalls eine Speicherung erfolgen kann, wird in einem folgenden Abschnitt (Abschnitt Komplex Strukturen und ihre Funktion) diskutiert.

Vergleich des Cryo-EM Modells mit der Kristallstruktur von FrhABG

Die Cryo-Elektronenmikroskopie hat sich zu einer Methode etabliert mit der die Struktur von makromolekularen Komplexen gelöst werden und sogar eine *de novo* Modellierung des Polypeptidrückgrats vorgenommen wird (Baker, Zhang et al. 2010). Vereinzelt kann sogar Elektronendichte für Seitenketten oder größere Cofaktoren und Substrate gezeigt werden (Baker et al. 2010). Für die Darstellung der FrhABG Elektronendichte wurde homogenes Protein in geringen Konzentrationen (0,2-0,5 mg/ml), in einer salzarmen Umgebung, auf sogenannten Grids in flüssigem Ethan schockgefroren. Dies ermöglicht die native Darstellung des Enzyms. Außerdem können diese Proteingrids über Jahrzehnte in Flüssigstickstoff gelagert werden, bevor sie für elektronenmikroskopische Studien verwendet werden. Eine teilweise langwierige Suche nach optimalen Kristallisationsbedingungen mit einem hohen Proteinverbrauch, entfällt. Genau wie die nicht zu unterschätzende Prozedur des Einfrierens und Vermessens des Kristalls und die Auswertung der gewonnen Daten. Außerdem entfällt bei Cryo-EM das Phasenproblem, das teilweise unlösbar ist. Die Kristallstruktur von FrhABG wäre möglicherweise aufgrund der Zwillingsseigenschaft der Kristalle ebenfalls nicht gelöst worden, wenn es nicht möglich gewesen wäre die SAD- und Cryo-EM-Phasen zu kombinieren und so die Phasen der Kristallstruktur wesentlich zu verbessern. Denn die Suche nach nicht verzwilligten Kristallen kann sich als langwierige Aufgabe erweisen, bei der es nicht erwiesen ist, tatsächlich FrhABG Kristalle ohne diese Eigenschaft zu züchten und gleichzeitig eine hohe Auflösung zu erreichen.

Sowohl im Cryo-EM Modell als auch in der Kristallstruktur formen die Polypeptidketten einen kubischen Komplex aus 12 Heterotrimeren und aus zwei Heterotrimeren bildet sich ein Dimer als mögliche funktionale Einheit. Die Elektronendichte der Metallzentren wurde in beiden Modellen gezeigt, lag aber nur in der atomaren Kristallstruktur definiert vor. Nur allein durch die Cryo-EM Elektronendichte konnten die FeS-Cluster, aufgrund der hohen Interferenzdichte, nicht eindeutig als [4Fe4S]-Cluster charakterisiert werden. Sequenzvergleiche aber zeigten die potentiellen Liganden der Cluster, die in der Kristallstruktur bestätigt wurden. Ein Nachteil der Cryo-EM ist, dass durch die niedrige Auflösung nicht jede Seitenkette ($<3 \text{ \AA}$) oder gar Wasserstoffatome ($<1 \text{ \AA}$) erhalten werden können, wie es mit der Röntgenstrukturanalyse möglich ist. Katalytische Mechanismen und der atomare Aufbau des Proteins können jedoch nur mit hohen Auflösungen beschrieben werden. Darum war es wichtig, neben dem Cryo-EM Modell eine hochaufgelöste Kristallstruktur von FrhABG zu lösen.

Die Kristallstruktur kann kaum mit dem Cryo-EM Modell verglichen werden, denn die beiden Elektronendichten zeigen sehr große Unterschiede in der jeweiligen Auflösungsgrenze. So war nicht eindeutig zu klären, welche Veränderung auf Strukturfehler oder auf strukturelle Veränderungen basieren. Ein Vergleich der Sekundärstruktur der drei FrhABG Untereinheiten zeigte jedoch keine gravierenden Unterschiede (Abbildung 54 A), dennoch waren nicht alle Strukturelemente in beiden Modellen wieder zu finden (Abbildung 54 B).

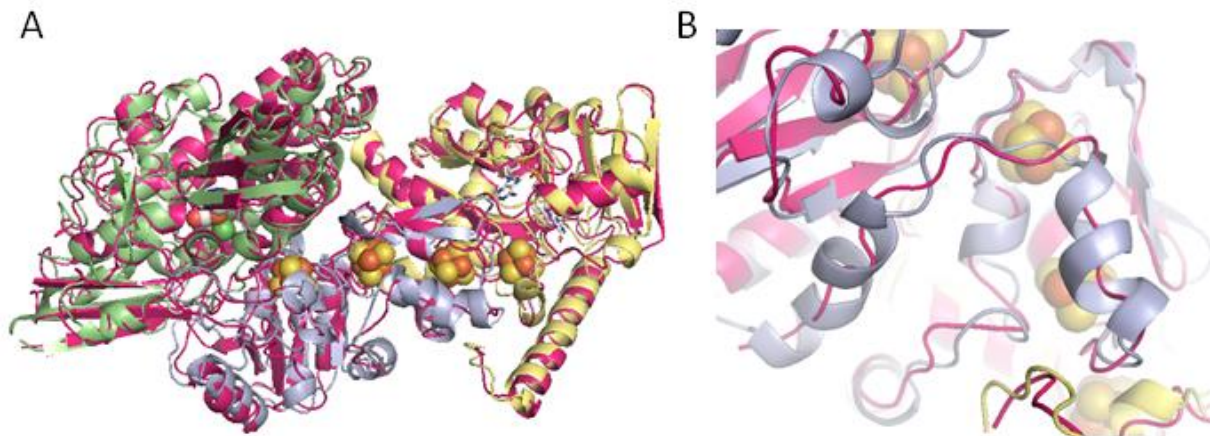


Abbildung 54: Sekundärstrukturvergleich der Kristallstruktur mit dem Cryo-EM Modell. A: Ein Vergleich der Kristallstruktur (in grün, blau und gelb) mit dem Cryo-EM Modell (magenta) zeigen auf den ersten Blick keine großen strukturellen Unterschiede. Das [NiFe]-Zentrum (grün/orange) und die [4Fe4S]-Cluster (gelb/orange) wurden in Kugeln dargestellt. B: Vergleich einer Region in FrhG, in der das Cryo-EM Modell versetzt zur Kristallstruktur ist und die Aminosäuren im Cryo-EM Modell keine α -Helix ausbilden. (Kristallstruktur: blau, Cryo-EM Modell: magenta).

Prinzipiell lässt sich sagen, dass oft Unterschiede in dem Cryo-EM Modell bezogen zur Kristallstruktur zu erkennen sind, wenn längere Abschnitte in der Elektronendichte ohne Sekundärstrukturelemente vorkommen. Von den Veränderungen der Sekundärstruktur und der Verschiebung von Resten sind die Bereiche um die Liganden der vier [4Fe4S]-Cluster und des [NiFe]-Zentrums nicht betroffen. Ein Grund dafür ist sicherlich die Verwendung der konservierten Liganden in dem Cryo-EM Modell als Ausgangspunkte zum Modellieren des Kohlenstoffrückrads. Die Abweichungen der Sekundärstruktur von FrhA und FrhG sind prinzipiell gering, da bereits bekannte Modelle beim Modellieren verwendet wurden. In der Sekundärstruktur von FrhB, das jeweils *de novo* gelöst wurde, zeigten die beiden Modelle teilweise unterschiedliche Interpretationen der Elektronendichte. Ein direkter Vergleich der FAD-Bindung ist aus oben beschriebenen Gründen nicht möglich. In der Cryo-EM konnte Dichte für das Substrat F₄₂₀ generiert werden, im Gegensatz zur Kristallstruktur. Anstelle des F₄₂₀ liegen in der Kristallstruktur an der gleichen Position die Reste Ser209 und Val210. In der Kristallstruktur wurde das F₄₂₀ in die sogenannte Substrattasche modelliert, so dass das C5-Atom neben dem N5-Atom von FAD in van-der-Waals Kontakt zueinander steht.

Modell der Komplex-Assemblierung

Der FrhABG Komplex setzt sich aus 12 Heterotrimeren zusammen. Die Assemblierung des Komplexes verläuft dabei wahrscheinlich über unterschiedliche Assemblierungsstufen (Abbildung 55 B). Interessanterweise ist in älteren Arbeiten oft die Rede von zwei unterschiedlich großen FrhABG Formen, wobei die kleinere aktive Form wird mit molekularen Massen von ca. 100 kDa und ca. 200 kDa beschrieben wird (Muth et al. 1987a; Baron und Ferry 1989a; Fiebig und Friedrich 1989; Lunsdorf et al. 1991). Dabei scheint es sich um das Heterotrimer oder ein Dimer aus zwei Heterotrimeren zu handeln.

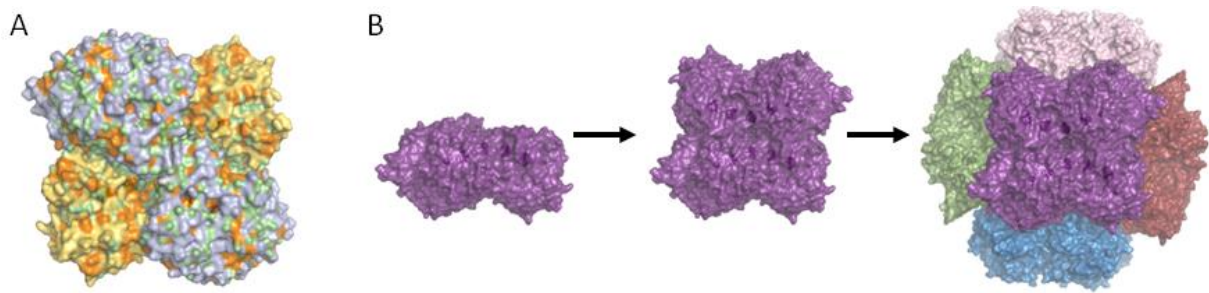


Abbildung 55: Modell der Komplex-Assemblierung. A: FrhABG Dimer mit den Untereinheiten FrhA (blau) und FrhB (gelb), die in das Innere des Komplexes zeigen. Die hydrophoben Bereiche (Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Phe und Met) sind in orange dargestellt. B: Zwei FrhABG Heterotrimere bilden als Komplexvorstufe ein Dimer in einer Kopf-Schwanz-Anordnung. Das Dimer ist verglichen mit A um 180° gedreht. Vermutlich schließen sich sechs Dimere zum FrhABG Komplex, zusammengesetzt aus 12 Heterotrimeren, zusammen. Ein FrhABG Dimer wurde in je einer Farbe (lila, rot, rosa, blau und grün) dargestellt. Das sechste Dimer ist wegen der Orientierung des Komplexes nicht sichtbar.

Daraus ist zu schließen, dass bei der Assemblierung des FrhABG Komplex als Vorstufe Dimere gebildet werden. Diese Erkenntnis lässt sich in dem Cryo-EM Modell und der Kristallstruktur in einer tetrahedralen Symmetrie wiederfinden. Je eine Seite des kubischen Komplexes besteht aus einem Dimer zweier Heterotrimere, die um eine zweizählige Achse in einer Kopf-Schwanz-Anordnung zueinander orientiert sind. Eine Dimerbildung, als Vorstufe zur Komplexbildung, kann auch bei SOR (Urich et al. 2004) beobachtet werden. Möglicherweise schließen sich sechs Dimere zu einem makromolekularen FrhABG Komplex zusammen. Dieser Zusammenschluss wird durch die hydrophobe Oberfläche der Dimere begünstigt. In anderen Strukturen wurde oft eine Verdrängung von Wassermoleküle an den Kontaktflächen beobachtet (Bahadur et al. 2003). Ein Zusammenschluss von einzelnen FrhABG Heterotrimeren zu dem FrhABG Komplex wird nicht als bevorzugte Assemblierung in Betracht gezogen, da die vielen hydrophoben oberflächenexponierten Reste zu unspezifischen Aggregationen neigen würden. Dagegen spricht auch, dass die beiden FrhG Untereinheiten eines Dimers 8,6% der Kontaktfläche teilen und damit weitaus mehr Kontakt haben, als Untereinheiten von einem zum anderen Dimer. Auch ist die Anzahl der beschriebenen Salzbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen von einem Heterotrimer zum anderen innerhalb eines Dimers um ein Vielfaches höher (Abschnitt 3.3.5).

Komplexe Strukturen und ihre Funktionen

Makromolekulare Komplexe werden sowohl im Cytoplasma als auch in der Membran gefunden. Bekannte Vertreter von löslichen Komplexen sind vor allem in der Signaltransduktion sowie im nuklearen Komplex oder in der Wechselwirkung mit RNA anzutreffen. Bei den hier genannten Komplexen handelt es sich häufig um Enzyme, die aufeinanderfolgende Reaktionsschritte katalysieren. Das prokaryotische Ribosom mit einem Sedimentationskoeffizienten von 70S bzw. einer molekularen Masse von 2,5 MDa, ist eins der größten bisher röntgenkristallographisch charakterisierten cytoplasmatischen Proteine (Schuwirth et al. 2005) mit einer Auflösungsgrenze von 3,5 Å. Die Fettsäuresynthese, mit einer molekularen Masse von 2,6 MDa, wurde mit der gleichen Methode zu einer Auflösungsgrenze von 4,0 Å

gelöst (Johansson et al. 2008) und stellt ein weiteres nennenswertes Beispiel der strukturellen Aufklärung von cytoplasmatischen makromolekularen Komplexen dar. Eine Ausbildung dieser Multienzymkomplexe hat wohl einen katalytischen Vorteil gegenüber einzelnen globulären Enzymen. Außerdem wird die enzymatisch aktive Konformation der einzelnen Untereinheiten durch die Komplexbildung stabilisiert. In der Methanogenese von H_2 und CO_2 sind neben FrhABG weitere makromolekulare Komplexe an der Bildung von Methan beteiligt (Abbildung 1). Jedoch bestehen die Multienzymkomplexe EhaA-T/EhbA-Q, MvhADG/HdrABC und MtrA-H aus mehreren verschiedenen Untereinheiten.

Da Membranen für Ionen, geladene und größere polare Verbindungen unpassierbar sind, sind Membranproteine notwendig, damit ausgewählte Substanzen die Membran überqueren oder durch diese transportiert werden können. In den Membranen liegen Proteine aufgrund der höheren Stabilität häufiger als Komplexe vor. Zu den bekannten Vertretern von Membrankomplexen zählen diejenigen der Atmungskette und der Photosynthese, außerdem spielen Komplexe wie Kanäle, Poren und Permeasen eine wichtige Rolle beim Membrantransport. In der Signaltransduktion sind trimere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) oder Synapsen beteiligt. Membrankomplexe wie die bakterielle Ferredoxin-NAD-Oxidoreduktase (Rnf) und die archaeelle Membran-assoziierte Ferredoxin-reduzierende [NiFe]-Hydrogenase (Ech) sind an der Energiekonservierung beteiligt, indem sie Natriumionen bzw. Protonen über die Membran translozieren und damit einen elektrochemischen Gradienten aufbauen.

Eine Frage die im Laufe dieser Arbeit nicht geklärt werden konnte, ist die, warum FrhABG diesen großen Komplex mit einem proteinleeren Raum im Inneren bildet. Bisher sind die Erklärungsversuche rein spekulativ, aber zukünftige Arbeiten werden diese Frage sicherlich beantworten. FrhABG liegt nicht nur in den thermophilen Methanogenen *M. marburgensis* (diese Arbeit) und *M. thermoformicum* (Braks et al. 1994), sondern auch in mesophilen Archaeen wie in *M. barkeri* Stamm Fusaro (Fiebig und Friedrich 1989), in *M. formicum* (Baron und Ferry 1989a), in *M. hungatei* (Sprott et al. 1987) und in *M. voltae* (Muth et al. 1987b) als makromolekularer Komplex vor, womit eine Komplexbildung als alleiniger Schutz vor hohen Temperaturen ausgeschlossen werden kann. Wie schon oben erwähnt könnten die Heterotrimere durch die Komplexbildung aber stabilisiert werden. Dies wäre für einen effektiven Elektronen- und Hydridtransfer von dem [NiFe]-Zentrum über FAD auf F_{420} wichtig. Möglicherweise hat die Komplexbildung bei FrhABG auch einen anderen Grund: die Kugel stellt in der Geometrie einen Körper mit maximalem Volumen bei geringster Oberfläche dar. FrhABG ist wie bereits erwähnt die quantitativ wichtigste Hydrogenase in der Methanogenese und bildet als globulärer Komplex eine Anlaufstelle für $F_{420}H_2$ -abhängige Proteine. Pro Komplex werden 12 funktionale Heterotrimere oder anders gesagt 12 Möglichkeiten der F_{420} -Reduktion bereitgestellt und dabei nimmt der Komplex nur einen Durchmesser von 185 Å ein.

Die Bedeutung der Poren zwischen den FrhB Untereinheiten kann ebenfalls, nur aufgrund der vorliegenden Strukturdaten, nicht eindeutig geklärt werden. Jedoch nutzen alle bekannten globulären Proteine diesen proteinleeren Raum (wie z.B. SOR und Bfr). Der Durchmesser der Pore in FrhABG erlaubt den Durchtritt von größeren Molekülen mittels einfacher Diffusion und erinnert an

Nanokompartimente, die Enzyme umschließen. Ein Kompartiment bietet Schutz und erhöht die Lebenserwartung der umschlossenen Enzyme erheblich (Sutter et al. 2008). Eine Speicherung von H_2 im Inneren von FrhABG, wie es für eine synthetisch hergestellten Mesopore mit einer carbonisierten Oberfläche und einem hohlen Kern gezeigt wurde (Fang et al. 2008), kann angenommen werden. Die Speicherung von Wasserstoff in solch einer Mesopore geschieht zwar elektrochemisch, aber durch das proteinähnliche Oberflächenmaterial ist die Diffusionsrate sehr gering. Der Durchmesser der Pore in FrhABG, wie sie in dem Röntgenstruktur- und dem Cryo-EM Modell vorliegt, ist jedoch für solch eine Speicherung eher zu groß. Gegen eine Wasserstoffspeicherung unter physiologischen Bedingungen im Inneren von FrhABG spricht auch, dass der bevorzugte hydrophobe Kanal an der Oberfläche des Komplexes liegt und damit gut zugänglich ist. Außerdem sind die [NiFe]-Zentren und die [4Fe4S]-Cluster im Inneren nicht frei zugänglich, wie es bei SOR für die Speicherung von linearem Polysulfid beschrieben wurde. Möglicherweise führen aber wasserstofflimitierende Bedingungen zu Interaktionen der Untereinheiten und damit zu einem Verschluss der Pore. So könnte im inneren Kompartiment das für die katalytische Aktivität wichtige H_2 gespeichert werden, eine Diffusion wäre nach Verschluss nicht ungehindert möglich. Der Wasserstoff könnte durch einen inneren hydrophoben Kanal zum [NiFe]-Zentrum gelangen. Wie unter diesen Bedingungen jedoch eine Anreicherung des Gases im Inneren erfolgen könnte und welchen Einfluss die Diffusion des Gases durch das Kohlenstoffgerüst hat, bleibt ebenfalls ungeklärt.

Die Wasserstoffspeicherung in FrhABG könnte aber auch auf einem anderen Weg geschehen, denn hydrophobe Reste sind dafür bekannt, dass sie Wasserstoff speichern (Teixeira et al. 2006). Zwar wurden keine Xenon-Markierungsversuche für FrhABG durchgeführt, die eine potentielle Speicherung mittels Röntgenstrukturanalyse gezeigt hätten, aber eine effektive Speicherung wäre dennoch im hydrophoben Kanal denkbar. Durch die geringe Oberfläche des Komplexes bezogen auf sein Volumen würde es zu einer geringen Diffusion des Gases in die Umgebung kommen. Einen Nutzen hätten durch diese Speicherung vor allem diejenigen Organismen, die unter Bedingungen mit geringem Wasserstoffpartialdruck leben, wie der Frischwasserorganismus *M. barkeri*. Dieses cytochromhaltige Archaeon kann methylo trope Methanogenese ohne H_2 betreiben, indem C1-Verbindungen wie Methanol, Methylsulfid oder Methylamin etc. als Substrate verwendet werden. Dabei wird die Methylgruppe auf CoM transferiert und von hier in einem Verhältnis 3:1 zu Methan und CO_2 disproportioniert. Während der Oxidation der Methyl-Gruppe zu CO_2 wird reduziertes $F_{420}H_2$ gebildet, das anschließend von dem FrhABG Komplex oxidiert wird (Abbildung 56). Dabei entsteht auch H_2 , das möglicherweise nicht unkontrolliert in die Umgebung abgegeben wird, sondern in den hydrophoben Kanälen des FrhABG Komplexes gespeichert werden könnte. Eine kontrollierte Abgabe des Wasserstoffs durch FrhABG ins Periplasma wäre denkbar, denn so könnte eine unkontrollierte Diffusion des Gases in die Umgebung verhindert werden, was dann nicht mehr zur direkten Verfügung stehen könnte. Ein solcher Mechanismus wurde bisher jedoch nicht gezeigt. Eine membranständige Hydrogenase (Vht/Vhx) oxidiert anschließend den Wasserstoff, dabei werden die zwei gebildeten Elektronen auf den membranlöslichen Elektronenakzeptor Methanophenazin (MP) übertragen.

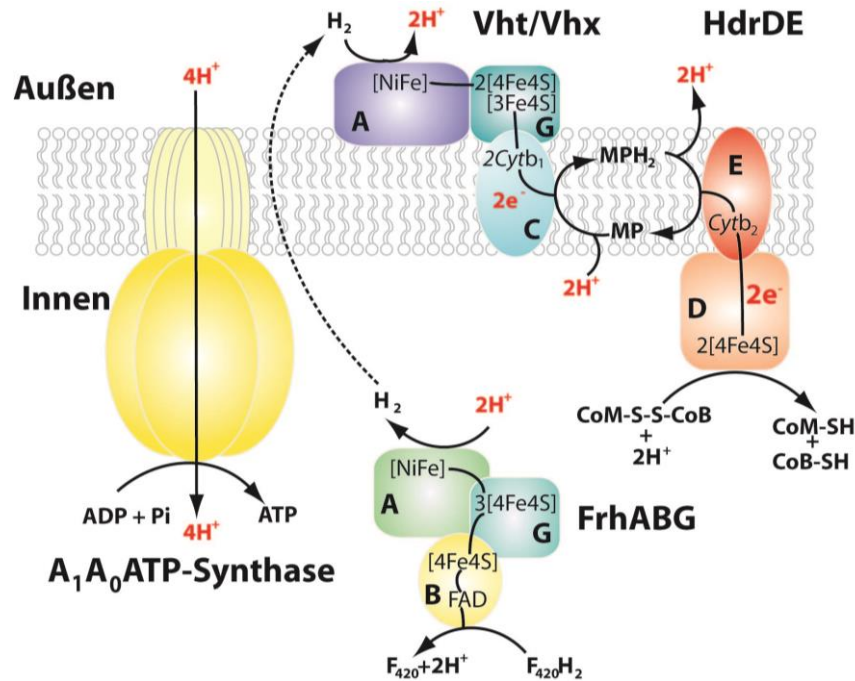


Abbildung 56: Mechanismus der Energiekonservierung bei methylothermem Wachstum von *M. barkeri*. F₄₂₀H₂, reduziertes Coenzym F₄₂₀; FrhABG, F₄₂₀-reduzierende [NiFe]-Hydrogenase; Cytb₁, Cytochrom b₁; HdrDE, membranständiger Heterodisulfid-Reduktase Komplex; MP, Methanophenazin; MPH₂, reduziertes MP; CoM-S-S-CoB, Heterodisulfid; Vht/Vhx, membranständige Methanophenazin-abhängige [NiFe]-Hydrogenase (nach Kulkarni et al. 2009).

Das reduzierte MPH₂ wird wiederum von der membranständigen HdrDE oxidiert, gleichzeitig wird CoM-S-S-CoB reduziert. Der elektrochemische Gradient wird von einer membranständigen Elektronentransportkette generiert, woraufhin ATP durch die A₁A₀-ATP-Synthase gebildet wird. Auch könnte eine Wasserstoffspeicherung in FrhABG sinnvoll sein, wenn methanogene Archaeen auf Formiat wachsen. Das durch die Oxidation von Formiat zu CO₂ anfallende F₄₂₀H₂ wird zu 50% unter Bildung von H₂ re-oxidiert, da dieses zur Reduktion von CoM-S-S-CoB und von Ferredoxin über den MvhADG/HdrABC Komplex benötigt wird (Abbildung 3).

Vergleich von FrhABG mit bekannten [NiFe]-Hydrogenase Strukturen

Keine der bekannten Strukturen von [NiFe]-Hydrogenasen liegt wie FrhABG als makromolekularer Komplex vor. Die meisten Strukturen sind Monomere und einige wurden als dimere Strukturen beschrieben (Ogata et al. 2010; Matias et al. 2001). Zudem stellt FrhABG die erste Kristallstruktur einer F₄₂₀-reduzierenden und archaellen [NiFe]-Hydrogenase dar. Auch ist die in dieser Arbeit beschriebene Struktur die erste einer [NiFe]-Hydrogenase der Gruppe 3, mit der zusätzlichen Untereinheit FrhB. Alle bisher bekannten Strukturen gehören dagegen zur Gruppe 1, mit generell nur zwei Untereinheiten. FrhABG oxidiert H₂ am aktiven [NiFe]-Zentrum und leitet die Elektronen anschließend über eine Kette aus vier [4Fe4S]-Cluster auf FAD, welches dann in die pro-S-Seite von F₄₂₀ ein Hydrid für die Reduktion überträgt. Die Reduktion von F₄₂₀ (E_o' = -360 mV) mit H₂ (E_o' = -414 mV) erfolgt nahe am thermodynamischen Gleichgewicht. Fasst man die neu gewonnenen Ergebnisse der Kristallstruktur

zusammen, lässt sich feststellen, dass FrhABG viele noch nie für [NiFe]-Hydrogenasen beschriebene Merkmale aufweist, die unsere Vorstellung über Hydrogenasen erweitern, und gleichzeitig einer optimalen Aktivität dienen.

FrhA ähnelt der großen Untereinheit bereits bekannter [NiFe]-Hydrogenasen, ist jedoch um 160 Reste kleiner. Dadurch resultiert ein von der Oberfläche gut zugänglicher hydrophober Kanal, der auf kürzestem Wege zum [NiFe]-Zentrum führt. Trotz des hohen Konservierungsgrads des aktiven [NiFe]-Zentrums und seiner Umgebung gibt es einige markante Unterschiede bei den beteiligten Aminosäuren. So liegt ein Aspartat nur 3,3 Å von dem eisenligierenden CO entfernt, formt aber aus geometrischen Gründen keine Wasserstoffbrücke mit CO. Die N-terminale Domäne von FrhG, die das proximale [4Fe4S]-Cluster trägt, ist strukturell ähnlich zu den bereits bekannten kleinen Untereinheiten der [NiFe]-Hydrogenasen. Dies unterstreicht die wichtige Rolle dieses Clusters bei der H₂-Oxidation. Scheinbar geringfügige Änderungen des Clusters oder der Liganden führen schon zu großen Unterschieden die z.B. die Sauerstofftoleranz oder das Redoxpotential des Clusters betreffen. So wurde in den Strukturen sauerstofftoleranter [NiFe]-Hydrogenasen (Fritsch et al. 2011; Shomura et al. 2011; Volbeda et al. 2012) ein [4Fe3S]-Cluster nachgewiesen, das von sechs Cysteinen koordiniert wird. ESR-Untersuchungen zeigten ein ungewöhnliches Redoxverhalten, das mit der Sauerstofftoleranz dieser Hydrogenasen in Verbindung gebracht wird (Pandelia et al. 2011). In FrhG wird dieses Cluster über ein ungewöhnliches Aspartat ligiert und wurde auch in anderen Methanogenen und in den noch nicht strukturell untersuchten hochaffinen [NiFe]-Hydrogenasen der Gruppe 5 als potentieller Ligand des proximalen Clusters identifiziert. In allen anderen [NiFe]-Hydrogenasen wird das proximale Cluster sonst immer von Cysteinen koordiniert (Higuchi et al. 1997; Higuchi et al. 1999; Montet et al. 1997; Matias et al. 2001; Volbeda et al. 2002; Volbeda et al. 2005; Ogata et al. 2010). Bisher wurde ein Aspartat-Ligand nur in Ferredoxin von zwei thermophilen Archaeen, in der Protochlorophyll Reduktase BchN-BchB und in Fnr, einem Genregulator für den anaeroben Metabolismus von *E. coli*, nachgewiesen. Katalytische Untersuchungen und Mutationsstudien bewiesen, dass es sich bei diesen [4Fe4S]-Clustern um äußerst sauerstoffempfindliche Cluster handelt. Aspartat stabilisiert den reduzierten Zustand (Calzolari et al. 1995; Imai et al. 2001) und begünstigt auch die Reversibilität vom reduzierten in den oxidierten Zustand von Fnr (Gruner et al. 2011). Mutationsstudien von BchN-BchB zeigten, dass Aspartat als Protonendonator eine wichtige Rolle für diese Enzymaktivität spielt (Muraki et al. 2010). Jedoch hat der Ligand keine Rolle für die Assemblierung des BchN-BchB Clusters, im Gegensatz zu den Cystein Liganden des gleichen [4Fe4S]-Clusters. Nur 6 Å von diesem [4Fe4S]-Cluster entfernt liegt ein weiteres Cystein. Dieses Cystein ist zwingend notwendig für die Aktivität und auch für die Assemblierung des BchN-BchB Komplexes (Muraki et al. 2010). Neben dem proximalen Cluster von FrhG liegt in einem Abstand von ca. 4,4 Å auch ein weiteres Cystein. Dieses konservierte Cys137 ist in den sauerstofftoleranten [NiFe]-Hydrogenasen an der Koordinierung des Fe₃ von dem proximalen [4Fe3S]-Cluster beteiligt (Fritsch et al. 2011). Eine potentielle Funktion dieses Cysteins in FrhG konnte bisher noch nicht gezeigt werden.

Das mediale und distale [4Fe4S]-Cluster von FrhG sind interessanterweise in einer Ferredoxin-ähnlichen Domäne gebettet, die dem Ferredoxin aus *P. asaccharolyticus* ähnelt. Dies ist das erste Beispiel einer [NiFe]-Hydrogenase Struktur, die eine solche Domäne aufweist. Ferredoxin stellt eine diverse Gruppe von Elektronentransferproteinen dar, die in Eukaryoten, Bakterien und Archaeen vorkommen (Nakos 1973; Guerlesquin 1988; Saeki 1992; Adman 2001) und ein relativ niedriges Redoxpotential von durchschnittlich $E_o' = -400$ mV aufweisen (Smith et al. 1991; Thamer et al. 2003). Ferredoxin wird eher von primitiveren Organismen im Stoffwechsel und der Elektronenbifurkation verwendet (Buckel und Thauer 2012), evolutionär weiter entwickelte Organismen haben dieses oft gegen NAD/NADP ausgetauscht (Daniel und Danson 1995). So verwendet das extrem thermophile Archaeon *P. furiosus* im Entner-Doudoroff-Weg ausschließlich Ferredoxin als Cofaktor und viele moderat thermophile Archaeen, wie *Sulfolobus*, benutzen schon NAD/NADP (Beinert 2000a). Des Weiteren ist das mediale Cluster in FrhG im Gegensatz zu denen der anderen [NiFe]-Hydrogenase Strukturen vom [4Fe4S]-Typ. Bisher waren nur Strukturen bekannt, bei denen dieses Cluster immer ein [3Fe4S]-Cluster zu sein schien. Der Unterschied der beiden Cluster-Typen ist mit dem Redoxverhalten zu erklären (Tabelle 9). Das [3Fe4S]-Cluster der Standardhydrogenasen hat ein relativ hohes Reduktionspotential, so dass der intramolekulare Elektronentransport zum distalen Cluster sehr endergon ist (Dementin et al. 2006). Für die funktionale Reversibilität von FrhABG ist es aber entscheidend, dass die Elektronen barrierefrei in beide Richtungen fließen können, also auch in umgekehrter Richtung vom $F_{420}H_2$ zum [NiFe]-Zentrum. Dies wird wohl durch das negative Redoxpotential des medialen FrhABG Clusters begünstigt (Tabelle 9). Die Marcus-Theorie kann möglicherweise eine Erklärung dazu liefern (Marcus 1956b; Marcus 1956a). Die 1956 aufgestellte Theorie befasst sich mit der allgemeinen Beschreibung von Elektrontransportreaktionen in Lösungsmitteln und stellt eine Beziehung der Übergangsrate für die Reaktion in [NiFe]-Hydrogenasen dar.

Tabelle 9: Apparentes Mittelpunktpotential strukturell bekannter [NiFe]-Hydrogenasen.

Redox-Zentrum	Apparentes Mittelpunktpotential [mV]						
	FrhABG ¹	<i>Allochro-matium vinosum</i> ²	<i>Ralstonia eutropha</i> ³	<i>Ralstonia metaliduras</i> ³	<i>Desulfo-vibrio vulgaris</i> ⁴	<i>Desulfo-vibrio gigas</i> ⁵	<i>Desulfo-vibrio fructovorans</i> ⁶
[4Fe4S] 2 ⁺ /1 ⁺ (proximal)	< -380	+87	-60/+160	+50	< -300	-290	-340
medial	< -380	+68	+25	+100	-70	-35	-65
[4Fe4S] 2 ⁺ /1 ⁺ (distal)	< -380	-78	-180	-80	< -300	-340	-340

1: diese Arbeit; 2: (Ogata et al. 2010); 3: (Knüttel 1994); 4: (Asso 1992); 5: (Teixeira et al. 1989) und 6: (Rousset et al. 1998)

Der Elektronentransfer vom [NiFe]-Zentrum über die FeS-Cluster zum F_{420} oder bei der Standardhydrogenase zum Cytochrom c_3 ist demnach ein isoenergetischer Tunnelprozess, bei dem die Proteinumgebung die räumliche Orientierung vorgibt und eine effektive Tunnelbarriere darstellt. Bei dem Elektronentransfer werden keine Bindungen geknüpft oder gebrochen, denn die Elektronen werden nur auf die äußeren Solvent-Moleküle der FeS-Cluster übertragen (outer-sphere). Die Kopplung der Cluster untereinander ist dabei schwach, so dass diese während der ganzen Reaktion ihre Identität behalten. Damit das Elektron springen kann, ändern sich die Kernposition der beiden Reaktanten und aller Lösungsmittelmoleküle nach dem schnellen Elektronensprung faktisch nicht (Franck-Condon-Prinzip); genau wie die Energie. Für den Elektronentransfer in FrhABG, ausgehend von der Oxidation des H_2 am [NiFe]-Zentrums, wie auch in umgekehrter Richtung vom $F_{420}H_2$, ist ein ähnliches Redoxpotential aller [4Fe4S]-Cluster sowie vom Wasserstoff und F_{420} entscheidend. Für eine Reversibilität, mit gleicher Geschwindigkeit für Hin- und Rückreaktion, dürfen keine Energiesprünge durch z.B. endergone Cluster bewerkstelligt werden. Der Aspartat Ligand des proximalen Clusters und der Austausch des konservierten Histidin Liganden gegen Cystein bei dem distalen Cluster von FrhABG scheinen das negative Redoxpotential dieser Cluster zu begünstigen. Ein mediales [3Fe4S]-Cluster, wie es in der [NiFe]-Standardhydrogenase gefunden wird, würde eine Reversibilität durch den endergonen Charakter auch eher verlangsamen, da die Aktivierungsenergie nach Marcus vergrößert und die Transferrate damit verkleinert werden würde. Nur durch ein mediales [4Fe4S]-Cluster kann gewährleistet werden, dass sich die Elektronentransferkette auf einem gleichen Energieniveau mit ähnlichen Redoxpotentialen befindet (Beinert 2000b). Das Beispiel des medialen [4Fe4S]-Clusters von FrhABG zeigt, dass eine Punktmutation einer einzigen Aminosäure ausreicht, dass diese nicht länger Ligand des Clusters ist bzw. diese Aminosäure zu einem Liganden wird und sich damit die Anzahl der Eisen im Cluster verändert (Beinert 2000a). Das mediale Cluster ist ein Beispiel, wie die Natur eine Feineinstellung vornimmt und damit Einfluss auf die katalytische Funktion des Proteins nimmt.

Ein mediales [4Fe4S]-Cluster wurde bisher nur noch in den [NiFeSe]-Hydrogenasen von *D. baculatum* (Garcin et al. 1999) und *D. vulgaris* Hildenborough (Valente et al. 2005; Matias et al. 2010) beschrieben. Das Redoxpotential E_o' dieser Cluster liegt aber nicht im negativen Bereich, wie es für alle [4Fe4S]-Cluster von FrhABG gezeigt wurde, sondern ist mit +150 mV sogar positiver, als das der anderen [NiFe]-Hydrogenasen (Tabelle 9). Mutationsstudien des medialen [3Fe4S]-Clusters der Standardhydrogenase in ein [4Fe4S]-Cluster führten zu keiner Veränderung der Reduktionsrate des natürlichen und artifiziellen Elektronenakzeptors (Rousset et al. 1998). Eine Konvertierung des medialen [4Fe4S]-Clusters der F_{420} -reduzierenden [NiFeSe]-Hydrogenase von *M. voltae* in ein [3Fe4S]-Cluster beeinflusste die Reduktion von F_{420} maßgeblich, nicht jedoch die des artifiziellen Elektronenakzeptor Benzylviologen (Bingemann und Klein 2000b). Eine Erklärung könnte sein, dass die Elektronen auf Höhe des proximalen Clusters oder davor direkt auf Benzylviologen übertragen werden.

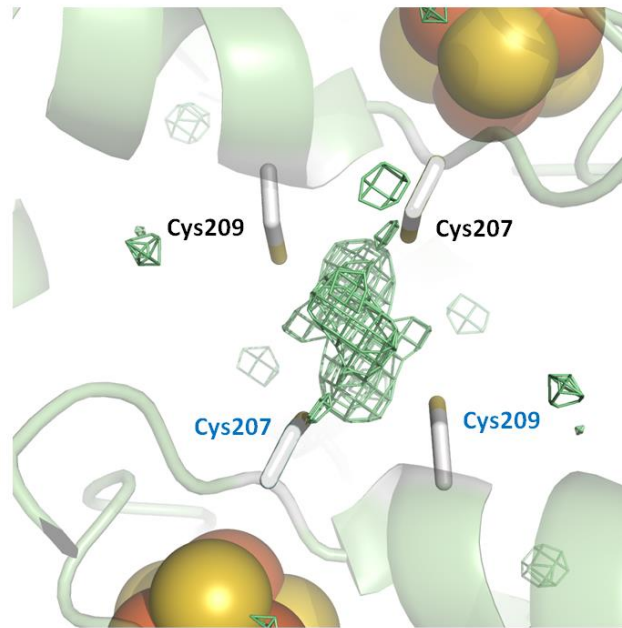


Abbildung 57: Potentielle Metallbindung in FrhG. In der Nähe des medialen Clusters von FrhG liegen zwei Cysteine (Cys207 und Cys209, beschriftet in schwarz) an der Grenze zu FrhG des Nachbartrimers gegenüber zwei äquivalenten Cysteinen (Cys 207 und Cys209, beschriftet in blau). In der Mitte wurde eine ausgeprägte Elektronendichte (grün), dargestellt bei 1,5 σ , möglicherweise für ein weiteres Metall, identifiziert. Die [4Fe4S]-Cluster (gelb/orange) wurden in Kugeln dargestellt.

Vom medialen Cluster entfernt liegen mit einem Abstand von 5,8 Å und 8,6 Å zwei Cysteine (Cys 207 und Cys 209), an der Grenze zu FrhG des Nachbarheterotrimers, gegenüber zwei äquivalenten Cysteinen, die bei diesem Elektronentransfer eine entscheidende Rolle einnehmen könnten. Zumal eine ausgeprägte zusätzliche Elektronendichte, die in einem Datensatz erhalten wurde, auf ein Metall (Abbildung 57) schließen lässt. Es sind bereits andere Beispiele bekannt, in denen ebenfalls über vier Cysteine ein Metall koordiniert wird und dieses eine Rolle bei dem Elektronentransfer einnimmt. Rubredoxin (Dauter et al. 1996), das Co-Chaperon HscB (Bitto et al. 2008) und die anaerobe Ribonuklotidreduktase (Logan et al. 2003) sind Beispiele dieser Enzyme. Das Metall wurde auch in diesen Strukturen nicht eindeutig identifiziert, man geht aber davon aus, dass es sich in den häufigsten Fällen um ein Zinkatom handelt. Dieses Zink nimmt eine wichtige Rolle bei den katalysierten Redoxreaktionen oder als Sensor für oxidativen Stress ein. Auch wird eine engere Bindung der Untereinheiten oder eine erleichterte Interaktion mit anderen Proteinen diskutiert. Wenn anstelle eines Zinkatoms ein Eisen von den Cysteinen koordiniert wird, kann es sich an der Übertragung von einzelnen Elektronen beteiligen.

Das distale [4Fe4S]-Cluster wird in FrhABG von vier Cysteinen koordiniert. In den bereits bekannten [NiFe]- und [NiSeFe]-Hydrogenase Strukturen erfolgt die Koordinierung dieses Clusters immer mit dem Stickstoff von Histidin, neben den drei Cysteinen. Wird das Histidin wie bei einer Mutante von *D. fructovorans* gegen ein Cystein eingetauscht, wird das Redoxpotential nicht beeinflusst (Rousset et al. 1998), aber die H₂-Oxidation wird stark minimiert und beträgt nur noch 1,5% (Dementin et al. 2006).

FrhB als F_{420} -bindende Untereinheit

Die Struktur von FrhABG ist auch das erste Beispiel einer [NiFe]-Hydrogenase mit einer zusätzlichen Untereinheit, FrhB. Diese strukturell noch nicht beschriebene Untereinheit bindet FAD in einer ungewöhnlich gestauchten Konformation und stellt gleichzeitig die Bindestelle für F_{420} dar. FrhB ist homolog zu anderen F_{420} -reduzierenden Enzymen der FrhB-Familie (Abbildung 38). Von den Mitgliedern waren bisher aber noch keine Strukturen bekannt. Die Aminosäuresequenz der FrhB-Familie ist nur in wenigen Bereichen konserviert, diese sind bei FrhB an der Koordinierung der Cofaktoren beteiligt. Neben den Mitgliedern der FrhB-Familie ist F_{420} für viele weitere Enzyme, die in Tabelle 10 zusammengefasst sind, sowohl in Archaeen, aber auch in Bakterien und Eukaryonten essentiell. Neben der FrhB-Familie wurden weitere 12 F_{420} -abhängige Oxidoreduktasen und 8 weitere F_{420} -abhängige Enzyme beschrieben, deren Strukturen teilweise gelöst werden konnten. Von den Oxidoreduktasen lassen sich einige aufgrund von Sequenzähnlichkeiten in die LuxA-Familie einteilen. Alle übrigen F_{420} -abhängigen Enzyme zeigen untereinander keine Ähnlichkeit. Alle bekannten Strukturen haben keine Ähnlichkeit zu FrhB, auch binden diese kein FAD, sondern andere Substrat wie Methylen- H_4 MPT⁺ oder NADP. Die Kristallstrukturen der Methylen- H_4 MPT-Reduktase (Mer, PDB-Code: 1z69) und der $F_{420}H_2$ -NADP⁺ Oxidoreduktase (Fno, PDB-Code: 1jay) zeigen, dass F_{420} in diesen Strukturen an der Oberfläche der Proteine gebunden wird. Die anderen beiden Strukturen, die Elektronendichte für F_{420} darstellen, sind die F_{420} -abhängige Alkoholdehydrogenase (Adf, PDB-Code: 1rhc) und die F_{420} -abhängige Methylen- H_4 MPT-Dehydrogenase (Mtd, PDB-Code: 1u6i)). Hier liegt die Elektronendichte für F_{420} in einer von der Oberfläche gut zugängliche Tasche, mit einem Porendurchmesser von 11,5 Å bzw. 14 Å.

Es konnte keine Kristallstruktur eines FrhABG- F_{420} -Komplexes erhalten werden, da aber F_{420} ausschließlich ein Hydrid-Donor/Akzeptor ist, setzt dies voraus, dass das N5-Atom von FAD und das C5-Atom von F_{420} in van-der-Waals Kontakt zueinander stehen. Aufgrund dieser Vorgaben wurde F_{420} in die Substrattasche von FrhB eingefügt. Die heterolog produzierte FrhB Untereinheit zeigte zudem eine $F_{420}H_2$ -oxidierende Aktivität. Es kann also davon ausgegangen werden, dass es sich bei FrhB tatsächlich um die F_{420} -bindende Untereinheit handelt. Ein nicht eindeutig identifiziertes Molekül, bei dem es sich vielleicht um das Additiv Trimethyl-N-Oxid handeln könnte, bindet kovalent am reaktiven Kohlenstoff des Flavins-Ringes und könnte die Bindung des F_{420} unter den kristallisierenden Bedingungen verhindern. Beide Coenzyme sind in der Solvens-zugänglichen Substrattasche lokalisiert, deren Öffnung einen Durchmesser von 8 Å hat. Diese Substrattasche ist vor allem durch aromatische und ungeladene Reste ausgekleidet, die eine Bindung von FAD und F_{420} erleichtern. Die Architektur der FAD-Bindestelle zählt nicht zu einer der vier charakterisierten FAD-haltigen Proteinfamilien (Dym und Eisenberg 2001). Es wurden für FrhB auch keine bereits bekannten Sequenzmotive beschrieben, die an der Bindung von FAD beteiligt sind.

Tabelle 10: F₄₂₀-abhängige Enzyme in unterschiedlichen Organismen. FrhB, Fsr, FdhB, FpoF, FqoF und FrdB werden zu einer Gruppe gezählt und sind grau unterlegt. Mer, Adf, Fgd, NpdI, NpdC und LmbY sind untereinander sequenzähnlich und werden zur LuxA-Familie gezählt. Alle anderen Enzyme (Mtd, FprA, Fno, F₄₂₀-Pyruvat-Synthase, F₄₂₀-Ketoglutarat-Synthase, Coff, FtsA, Ddn, Fdr, Phr) zeigen untereinander keine Sequenzverwandtschaft. Phr enthält F₀, dies ist ein F₄₂₀-Derivat ohne Phosphatseitengruppen. Enzyme, die nicht zur Klasse der Oxidoreduktasen gehören: FtsA, F₄₂₀:Pyruvat-Synthetase, F₄₂₀:Ketoglutarat-Synthase, γ -F₄₂₀-2: α -L-Glutamat-Ligase, Coff, Phr. Die Sequenzidentität ist auf die Primärstruktur bezogen und wurde mit dem Programm EMBOSS Needle berechnet.

F ₄₂₀ -abhängige Enzyme	Abkürzung	Sequenz-Identität ^a	Kristallstruktur
FrhB-Familie			
F ₄₂₀ -reduzierende [NiFe]-Hydrogenase ¹	FrhB	100% ^b	-
F ₄₂₀ :Sulfit-Reduktase ⁶	Fsr	40% ^m	-
F ₄₂₀ -abhängige Formiat Dehydrogenase	FdhB	25%	-
F ₄₂₀ H ₂ -Dehydrogenase Komplex	FpoF	35% ^c	-
F ₄₂₀ H ₂ :Quinon Oxidoreduktase Komplex ³	FqoF	36%	-
Untereinheit 4 der F ₄₂₀ -abhängigen Glutamatsynthase		37%	-
F ₄₂₀ :Formiat-Dehydrogenase	FrdB	25% ^d	-
LuxA-Familie			
Methylen-H ₄ MPT-Reduktase	Mer	100% ¹	Mer aus <i>Methanosarcina barkeri</i> mit gebundenem F ₄₂₀ ¹
F ₄₂₀ :Alkohol-Dehydrogenase	Adf	21%	Adf aus <i>Methanococcus thermophilus</i> mit gebundenem F ₄₂₀ ²
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase ¹⁰	Fgd	19%	Fgd aus <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ³
Picrinsäure-Reduktase	NpdI	23%	-
Hydrid-Transferase I	NpdC	16%	-
F ₄₂₀ -abhängige Oxidoreduktase	LmbY	20%	-
Methylen-H ₄ MPT-Dehydrogenase ¹	Mtd		Mtd aus <i>Methanopyrus kandleri</i> mit gebundenem F ₄₂₀ und H ₄ MPT ⁺ ⁴
F ₄₂₀ H ₂ -Oxidase ²	FprA		-
F ₄₂₀ H ₂ :NADP ⁺ -Oxidoreduktase ⁹	Fno		Fno aus <i>Archaeoglobus fulgidus</i> mit gebundenem F ₄₂₀ und NADP ⁵
γ -F ₄₂₀ -2: α -L-Glutamat-Ligase ¹²	Coff		-
Deazaflavin-abhängige-Nitroreduktase ¹¹	Ddn		-
F ₄₂₀ H ₂ -abhängige-Reduktase	Fdr		Fdr aus <i>Mycobacterium smegmatis</i> ⁶
F ₃₉₀ -Synthase ⁷	FtsA		-
F ₃₉₀ -Hydrolase ⁸			-
F ₄₂₀ :Pyruvat-Synthetase ⁴			-
F ₄₂₀ :Ketoglutarat-Synthase ⁵			-
8-HDF-Photolyase ^{13, 14, 15, 16}	Phr		Phr aus <i>Anacystis nidulans</i> mit gebundenem FAD und F ₀ ⁷

¹ (Aufhammer et al. 2005), ² (Aufhammer et al. 2004), ³ (Bashiri et al. 2008), ⁴ (Ceh et al. 2009), ⁵ (Warkentin et al. 2001), ⁶ (Taylor et al. 2010), ⁷ (Tamada et al. 1997).

Tyrosine bilden stabile van-der Waals-Kontakte zum FAD aus und stabilisieren so ebenfalls den Cofaktor. Dies ist notwendig um einen effektiven Hydridtransfer auf F_{420} zu gewährleisten. Da FAD ein Ein- und Zwei-Elektronendonator/-akzeptor ist, nimmt dieses zweimal ein Elektron über die Elektronentransferkette vom $[4Fe4S]$ -Cluster der FrhB Untereinheit auf. Dieses Cluster steht mit auffällig vielen positiv geladenen Resten in Kontakt, die ebenfalls die positiv geladene Umgebung stabilisieren und vorzugsweise als reduziertes $[4Fe4S]$ -Cluster vorliegt. Anschließend überträgt FAD ein Hydrid auf das Coenzym F_{420} . Dabei sorgt Pro57 für genügend Raum, damit das F_{420} neben dem FAD zum Erliegen kommen kann. Dabei sind das Ribitol, das Pyrophosphat und das Polyglutamat von F_{420} entlang der Öffnung der Substrattasche orientiert. Bei der Bindung von F_{420} verändert sich wahrscheinlich die Konformation von Tyr76 und Glu136. Diese beiden Reste sind dann an der Verankerung des Cofaktors neben dem FAD wichtig. In direkter Nähe zum FAD und F_{420} liegen Asp25, Asp162 und Gln24, die wahrscheinlich nicht nur wichtig für ein niedriges Redoxpotential sind, sondern auch eine wichtige katalytische Rolle beim Hydridtransfer einnehmen, indem sie Protonen für die Reduktion von FAD zur Verfügung stellen. Versuche mit deuteriertem Wasser haben gezeigt, dass die Protonen nicht von der H_2 -Oxidation am $[NiFe]$ -Zentrum stammen (Livingston et al. 1987). Diese Protonen werden aber an der Oberfläche in eine Furche entlassen, in der die Öffnung der Substrattasche liegt.

5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte FrhABG zur Homogenität aufgereinigt werden. Es war möglich, sowohl die Cryo-EM Struktur, als auch die Kristallstruktur von FrhABG zu lösen. In der Cryo-EM wurde Elektronendichte für F_{420} gezeigt, die nur bei Anwesenheit des Substrats sichtbar war. Bisher war es aber nicht möglich, Elektronendichte für F_{420} in einer hochaufgelösten Kristallstruktur zu zeigen. Möglicherweise spielt das unbekannte Adukt am FAD eine entscheidende Rolle, die keine Bindung des Substrats unter den gegebenen Kristallisationsbedingungen zulässt. Obwohl F_{420} durch Informationen die den Hydridtransfer in die Pro-S-Position betreffen, unabhängig von dem bekannten Cryo-EM Modell, nachträglich in die Kristallstruktur modelliert wurde, wäre jedoch für eine exakte atomare Beschreibung des Hydridtransfers von FAD zum F_{420} eine Struktur mit sichtbarer Elektronendichte von F_{420} interessant. Für diese Struktur wäre ein erneutes Kristallisationsscreening von FrhABG in Anwesenheit von F_{420} sinnvoll, da eine Kokristallisation mit F_{420} unter den bekannten Bedingungen bzw. ein Substrattränkung sowohl unter reduzierten als auch unter oxidierten Bedingungen nicht zu einer Struktur mit Elektronendichte für F_{420} führte.

FrhABG bildet einen makromolekularen Komplex von 1250 kDa. Wozu diese F_{420} -reduzierende $[NiFe]$ -Hydrogenase diesen großen Komplex bildet, ist bisher unbekannt und wirft viele interessante Fragen auf. Eine elementare Frage ist, ob FrhABG Wasserstoff speichert. Möglicherweise könnte eine Xenon-Markierung eines FrhABG Kristalls und die strukturelle Auswertung diese Frage klären. Ob diese

Wasserstoffspeicherung jedoch tatsächlich unter physiologischen Bedingungen bei methylotrophem Wachstum bzw. Wachstum auf Formiat stattfinden, lässt sich nur durch katalytische Enzymtests oder gezielte Mutationsstudien klären. Eine [NiFe]-Hydrogenase der Gruppe 3 aus *P. furiosus* wurde in *E. coli*, ohne zusätzliche Maturationsproteine von *P. furiosus*, aktiv produziert (Sun et al. 2010) und gibt Anlass zur Hoffnung, dass FrhABG ebenfalls heterolog produziert werden kann. Würde es also gelingen FrhABG aktiv und möglichst als komplexe Struktur mit 12 Heterotrimeren in *E. coli* zu produzieren, würde dies einen völlig neuen, revolutionären Weg in der Aufklärung der katalytischen Funktion dieses Enzyms eröffnen.

6 Literaturverzeichnis

- Adman, S. u. 2001. The 2[4Fe-4S] ferredoxins. Messerschmidt A, Huber R, Poulos T, Wieghardt K (eds) Hand-book of metalloproteins. Wiley, Chichester:574–592.
- Afting, C., A. Hochheimer, and R. K. Thauer. 1998. Function of H₂-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* in coenzyme F₄₂₀ reduction with H₂. Archives of Microbiology 169 (3):206-210.
- Albracht, S. P. 1994. Nickel hydrogenases: in search of the active site. Biochim Biophys Acta 1188 (3):167-204.
- Alex, L. A., J. N. Reeve, W. H. Ormejohnson, and C. T. Walsh. 1990a. Cloning, Sequence determination and Expression of the Genes encoding the Subunits of the Nickel-containing 8-Hydroxy-5-Deazaflavine reducing Hydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* Delta-H Biochemistry 29 (31):7237-7244.
- . 1990b. Cloning, Sequence determination, and Expression of the Genes encoding the Subunits of the Nickel-containing 8-Hydroxy-5-Deazaflavin reducing Hydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* Delta-H. Biochemistry 29 (31):7237-7244.
- Armstrong und Albracht, S. P. 2005. [NiFe]-hydrogenases: spectroscopic and electrochemical definition of reactions and intermediates. Philos Transact A Math Phys Eng Sci 363 (1829):937-954; discussion 1035-1040.
- Asso, G., Yagi, Bertrand. 1992. EPR and redox properties of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki hydrogenase-comparison with the [NiFe] enzyme from *Desulfovibrio gigas*. Biochim Biophys Acta 1122:50-56.
- Aufhammer, S. W., E. Warkentin, H. Berk, S. Shima, R. K. Thauer, and U. Ermler. 2004. Coenzyme binding in F₄₂₀-dependent secondary alcohol dehydrogenase, a member of the bacterial luciferase family. Structure 12 (3):361-370.
- Aufhammer, S. W., E. Warkentin, U. Ermler, C. H. Hagemeyer, R. K. Thauer, and S. Shima. 2005. Crystal structure of methylenetetrahydromethanopterin reductase (Mer) in complex with coenzyme F₄₂₀: Architecture of the F₄₂₀/FMN binding site of enzymes within the nonprolyl cis-peptide containing bacterial luciferase family. Protein Sci 14 (7):1840-1849.
- Bahadur, R. P., P. Chakrabarti, F. Rodier, and J. Janin. 2003. Dissecting subunit interfaces in homodimeric proteins. Proteins 53 (3):708-719.
- Baker, M. L., J. Zhang, S. J. Ludtke, and W. Chiu. 2010. Cryo-EM of macromolecular assemblies at near-atomic resolution. Nat Protoc 5 (10):1697-1708.
- Baron, S. F., D. P. Brown, and J. G. Ferry. 1987. Locations of the hydrogenases of *Methanobacterium formicicum* after subcellular fractionation of cell extract. J Bacteriol 169 (8):3823-3825.
- Baron und Ferry, J. G. 1989a. Purification and properties of the membrane-associated coenzyme F₄₂₀-reducing hydrogenase from *Methanobacterium formicicum*. J Bacteriol 171 (7):3846-3853.
- . 1989b. Reconstitution and properties of a coenzyme F₄₂₀-mediated formate hydrogenlyase system in *Methanobacterium formicicum*. J Bacteriol 171 (7):3854-3859.
- Bashiri, G., C. J. Squire, N. J. Moreland, and E. N. Baker. 2008. Crystal structures of F₄₂₀-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase FGD1 involved in the activation of the anti-tuberculosis drug candidate PA-824 reveal the basis of coenzyme and substrate binding. J Biol Chem 283 (25):17531-17541.
- Beinert, H. 2000a. Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. J Biol Inorg Chem 5 (1):2-15.
- . 2000b. Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises (vol 5, pg 2, 2000). Journal of Biological Inorganic Chemistry 5 (3):409-409.
- Bingemann und Klein, A. 2000a. Conversion of the central [4Fe-4S] cluster into a [3Fe-4S] cluster leads to reduced hydrogen-uptake activity of the F₄₂₀-reducing hydrogenase of *Methanococcus voltae*. European Journal of Biochemistry 267 (22):6612-6618.
- . 2000b. Conversion of the central [4Fe-4S] cluster into a [3Fe-4S] cluster leads to reduced hydrogen-uptake activity of the F₄₂₀-reducing hydrogenase of *Methanococcus voltae*. Eur J Biochem 267 (22):6612-6618.
- Bitto, E., C. A. Bingman, L. Bittova, D. A. Kondrashov, R. M. Bannen, B. G. Fox, J. L. Markley, and G. N. Phillips, Jr. 2008. Structure of human J-type co-chaperone HscB reveals a tetracysteine metal-binding domain. J Biol Chem 283 (44):30184-30192.

- Böck, A., P. W. King, M. Blokesch, and M. C. Posewitz. 2006. Maturation of hydrogenases. *Adv Microb Physiol* 51:1-71.
- Boisvert, D. C., J. Wang, Z. Otwinowski, A. L. Horwich, and P. B. Sigler. 1996. The 2.4 Å crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL complexed with ATP gamma S. *Nat Struct Biol* 3 (2):170-177.
- Braks, I. J., M. Hoppert, S. Roge, and F. Mayer. 1994. Structural aspects and immunolocalization of the F₄₂₀-reducing and non-F₄₂₀-reducing hydrogenases from *Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg. *J Bacteriol* 176 (24):7677-7687.
- Bruggemann, H., F. Falinski, and U. Deppenmeier. 2000. Structure of the F₄₂₀H₂:quinone oxidoreductase of *Archaeoglobus fulgidus* identification and overproduction of the F₄₂₀H₂-oxidizing subunit. *Eur J Biochem* 267 (18):5810-5814.
- Brunger, A. T. 1992. Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* 355 (6359):472-475.
- Bryson, K., L. J. McGuffin, R. L. Marsden, J. J. Ward, J. S. Sodhi, and D. T. Jones. 2005. Protein structure prediction servers at University College London. *Nucleic Acids Res* 33 (Web Server issue):W36-38.
- Buckel und Thauer, R. K. 2012. Energy conservation via electron bifurcating ferredoxin reduction and proton/Na⁽⁺⁾ translocating ferredoxin oxidation. *Biochim Biophys Acta*.
- Caffrey, S. M., H. S. Park, J. K. Voordouw, Z. He, J. Zhou, and G. Voordouw. 2007. Function of periplasmic hydrogenases in the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *J Bacteriol* 189 (17):6159-6167.
- Calzolari, L., C. M. Gorst, Z. H. Zhao, Q. Teng, M. W. Adams, and G. N. La Mar. 1995. 1H NMR investigation of the electronic and molecular structure of the four-iron cluster ferredoxin from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. Identification of Asp14 as a cluster ligand in each of the four redox states. *Biochemistry* 34 (36):11373-11384.
- Ceh, K., U. Demmer, E. Warkentin, J. Moll, R. K. Thauer, S. Shima, and U. Ermler. 2009. Structural basis of the hydride transfer mechanism in F₄₂₀-dependent methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase. *Biochemistry* 48 (42):10098-10105.
- Çinkaya, I. 2002. Substrat induzierte Radikalbildung in dem Eisen-Schwefel Flavoenzym 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase aus *Clostridium aminobutyricum*
- Conrad, R., M. Aragno, and W. Seiler. 1983. Production and consumption of hydrogen in a eutrophic lake. *Appl Environ Microbiol* 45 (2):502-510.
- Constant, P., S. P. Chowdhury, L. Hesse, J. Pratscher, and R. Conrad. 2011. Genome data mining and soil survey for the novel group 5 [NiFe]-hydrogenase to explore the diversity and ecological importance of presumptive high-affinity H₂-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol* 77 (17):6027-6035.
- Constant, P., S. P. Chowdhury, J. Pratscher, and R. Conrad. 2010. *Streptomyces* contributing to atmospheric molecular hydrogen soil uptake are widespread and encode a putative high-affinity [NiFe]-hydrogenase. *Environ Microbiol* 12 (3):821-829.
- Daniel und Danson, M. J. 1995. Did primitive microorganisms use nonhem iron proteins in-place of NAD/P. *Journal of Molecular Evolution* 40 (6):559-563.
- Dautant, A., J. B. Meyer, J. Yarov, G. Precigoux, R. M. Sweet, A. J. Kalb, and F. Frolova. 1998. Structure of a monoclinic crystal form of cytochrome *b1* (Bacterioferritin) from *E. coli*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54 (Pt 1):16-24.
- Dauter, Z., K. S. Wilson, L. C. Sieker, J. M. Moulis, and J. Meyer. 1996. Zinc- and iron-rubredoxins from *Clostridium pasteurianum* at atomic resolution: a high-precision model of a ZnS₄ coordination unit in a protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (17):8836-8840.
- DeLano, W. L. 2002. The Pymol User's Manual. .
- Dementin, S., V. Belle, P. Bertrand, B. Guigliarelli, G. Adryanczyk-Perrier, A. L. De Lacey, V. M. Fernandez, M. Rousset, and C. Leger. 2006. Changing the ligation of the distal [4Fe4S] cluster in [NiFe] hydrogenase impairs inter- and intramolecular electron transfers. *J Am Chem Soc* 128 (15):5209-5218.
- Dutta und Berman, H. M. 2005. Large macromolecular complexes in the Protein Data Bank: a status report. *Structure* 13 (3):381-388.
- Dym und Eisenberg, D. 2001. Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Sci* 10 (9):1712-1728.

- Eirich, L. D., G. D. Vogels, and R. S. Wolfe. 1978. Proposed structure for coenzyme F₄₂₀ from *Methanobacterium*. *Biochemistry* 17 (22):4583-4593.
- Emsley und Cowtan, K. 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60 (Pt 12 Pt 1):2126-2132.
- Fang, B., M. Kim, J. H. Kim, and J. S. Yu. 2008. Controllable synthesis of hierarchical nanostructured hollow core/mesopore shell carbon for electrochemical hydrogen storage. *Langmuir* 24 (20):12068-12072.
- Fiebig und Friedrich, B. 1989. Purification of the F₄₂₀-reducing hydrogenase from *Methanosarcina barkeri* (strain Fusaro). *Eur J Biochem* 184 (1):79-88.
- Fox, J. A., D. J. Livingston, W. H. Orme-Johnson, and C. T. Walsh. 1987. 8-Hydroxy-5-deazaflavin-reducing hydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*: 1. Purification and characterization. *Biochemistry* 26 (14):4219-4227.
- Fritsch, J., P. Scheerer, S. Frielingsdorf, S. Kroschinsky, B. Friedrich, O. Lenz, and C. M. Spahn. 2011. The crystal structure of an oxygen-tolerant hydrogenase uncovers a novel iron-sulphur centre. *Nature*.
- Garcin, E., X. Vernede, E. C. Hatchikian, A. Volbeda, M. Frey, and J. C. Fontecilla-Camps. 1999. The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center. *Structure with Folding & Design* 7 (5):557-566.
- Ge und Zhou, Z. H. 2011. Hydrogen-bonding networks and RNA bases revealed by cryo electron microscopy suggest a triggering mechanism for calcium switches. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (23):9637-9642.
- Gipson, P., D. J. Mills, R. Wouts, M. Grininger, J. Vonck, and W. Kuhlbrandt. 2010. Direct structural insight into the substrate-shuttling mechanism of yeast fatty acid synthase by electron cryomicroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (20):9164-9169.
- Gruner, I., C. Fradrich, L. H. Bottger, A. X. Trautwein, D. Jahn, and E. Hartig. 2011. Aspartate 141 is the fourth ligand of the oxygen-sensing [4Fe-4S]²⁺ cluster of *Bacillus subtilis* transcriptional regulator Fnr. *J Biol Chem* 286 (3):2017-2021.
- Guerlesquin, B. u. 1988. Structure, function and evolution of bacterial ferredoxins. *FEMS Microbiol Rev* 4 (2):155-175.
- Harrison und Arosio, P. 1996. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* 1275 (3):161-203.
- Higuchi, Y., H. Ogata, K. Miki, N. Yasuoka, and T. Yagi. 1999. Removal of the bridging ligand atom at the Ni-Fe active site of [NiFe] hydrogenase upon reduction with H₂, as revealed by X-ray structure analysis at 1.4 Å resolution. *Structure* 7 (5):549-556.
- Higuchi, Y., T. Yagi, and N. Yasuoka. 1997. Unusual ligand structure in Ni-Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis. *Structure* 5 (12):1671-1680.
- Hoffmann, K. 2003. Charakterisierung und Kristallisation der Elektroneneinspeisenden Module der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase. Dissertation.
- Imai, T., K. Taguchi, Y. Ogawara, D. Ohmori, F. Yamakura, H. Ikezawa, and A. Urushiyama. 2001. Characterization and cloning of an extremely thermostable, *Pyrococcus furiosus*-type 4Fe ferredoxin from *Thermococcus profundus*. *J Biochem* 130 (5):649-655.
- Jacobson, F. S., L. Daniels, J. A. Fox, C. T. Walsh, and W. H. Ormejohnson. 1982a. Purification and properties of an 8-Hydroxy-5-Deazaflavin-reducing Hydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* *Journal of Biological Chemistry* 257 (7):3385-3388.
- . 1982b. Purification and properties of an 8-Hydroxy-5-Deazaflavin-reducing Hydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* *Journal of Biological Chemistry* 257 (7):3385-3388.
- Janda und Hemmerich, P. 1976. 5-deaza-thiariboflavins and 5-thiariboflavins - simple pathway to antitabolites of vitamine B₂ *Angewandte Chemie-International Edition in English* 15 (7):443-444.

- Johansson, P., B. Wiltschi, P. Kumari, B. Kessler, C. Vornrhein, J. Vonck, D. Oesterhelt, and M. Grninger. 2008. Inhibition of the fungal fatty acid synthase type I multienzyme complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (35):12803-12808.
- Johnson und Mukhopadhyay, B. 2005. A new type of sulfite reductase, a novel coenzyme F₄₂₀-dependent enzyme, from the methanarchaeon *Methanocaldococcus jannaschii*. *J Biol Chem* 280 (46):38776-38786.
- Kabsch, W. 2010. Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66 (Pt 2):125-132.
- Kaster, A. K., M. Goenrich, H. Seedorf, H. Liesegang, A. Wollherr, G. Gottschalk, and R. K. Thauer. 2011a. More than 200 genes required for methane formation from H₂ and CO₂ and energy conservation are present in *Methanothermobacter marburgensis* and *Methanothermobacter thermoautotrophicus*. *Archaea* 2011:973848.
- Kaster, A. K., J. Moll, K. Parey, and R. K. Thauer. 2011b. Coupling of ferredoxin and heterodisulfide reduction via electron bifurcation in hydrogenotrophic methanogenic archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (7):2981-2986.
- Keweloh. 1980. Abbau von Faktor F₄₂₀ in *Methanobacterium thermoautotrophicum* bei Einwirkung von O₂. . Diploma thesis, Philips-Universität, Marburg.
- Knüttel. 1994. Redox properties of the metal centers in the membrane-bound hydrogenase from *Alcaligenes aquifexaerolius eutrophus* CH34. . *Bull Pol Acad Sci Chem* 42:495-511.
- Kojima, N., J. A. Fox, R. P. Hausinger, L. Daniels, W. A. Orme-Johnson, and C. Walsh. 1983. Paramagnetic centers in the nickel-containing, deazaflavin reducing hydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 80:378-382.
- Kulkarni, G., D. M. Kridelbaugh, A. M. Guss, and W. W. Metcalf. 2009. Hydrogen is a preferred intermediate in the energy-conserving electron transport chain of *Methanosarcina barkeri*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (37):15915-15920.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680-685.
- Liesegang, H., A. K. Kaster, A. Wiezer, M. Goenrich, A. Wollherr, H. Seedorf, G. Gottschalk, and R. K. Thauer. 2010. Complete genome sequence of *Methanothermobacter marburgensis*, a methanoarchaeon model organism. *J Bacteriol* 192 (21):5850-5851.
- Livingston, D. J., J. A. Fox, W. H. Orme-Johnson, and C. T. Walsh. 1987. 8-Hydroxy-5-deazaflavin-reducing hydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*: 2. Kinetic and hydrogen-transfer studies. *Biochemistry* 26 (14):4228-4237.
- Logan, D. T., E. Mulliez, K. M. Larsson, S. Bodevin, M. Atta, P. E. Garnaoud, B. M. Sjöberg, and M. Fontecave. 2003. A metal-binding site in the catalytic subunit of anaerobic ribonucleotide reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (7):3826-3831.
- Ludtke, S. J., M. L. Baker, D. H. Chen, J. L. Song, D. T. Chuang, and W. Chiu. 2008. De novo backbone trace of GroEL from single particle electron cryomicroscopy. *Structure* 16 (3):441-448.
- Ludtke, S. J., P. R. Baldwin, and W. Chiu. 1999. EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J Struct Biol* 128 (1):82-97.
- Lunsdorf, H., M. Niedrig, and K. Fiebig. 1991. Immunocytochemical localization of the coenzyme F₄₂₀-reducing hydrogenase in *Methanosarcina barkeri* Fusaro. *J Bacteriol* 173 (3):978-984.
- Marcus, R. A. 1956a. Electrostatic Free Energy and Other Properties of States Having Nonequilibrium Polarization I. *J.Chem.Phys.* 24 (979).
- Marcus, R. A. 1956b. On the Theory of Oxidation-Reduction Reactions Involving Electron Transfer I. *J.Chem.Phys.* 24 (966).
- Marcus, R. A. 1956c. On the Theory of Oxidation-Reduction Reactions Involving Electron Transfer. I *Journal of Chemical Physics* 24 (5):13.
- Marques, M. C., R. Coelho, A. L. De Lacey, I. A. Pereira, and P. M. Matias. 2010. The three-dimensional structure of [NiFeSe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: a hydrogenase without a bridging ligand in the active site in its oxidised, "as-isolated" state. *J Mol Biol* 396 (4):893-907.
- Massanz, C., S. Schmidt, and B. Friedrich. 1998. Subforms and in vitro reconstitution of the NAD-reducing hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* 180 (5):1023-1029.
- Matias, P. M., M. C. Marques, R. Coelho, A. L. De Lacey, and I. A. C. Pereira. 2010. The Three-Dimensional Structure of [NiFeSe] Hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: A

- Hydrogenase without a Bridging Ligand in the Active Site in Its Oxidised, "as-Isolated" State. *Journal of Molecular Biology* 396 (4):893-907.
- Matias, P. M., C. M. Soares, L. M. Saraiva, R. Coelho, J. Morais, J. Le Gall, and M. A. Carrondo. 2001. [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774: gene sequencing, three-dimensional structure determination and refinement at 1.8 Å and modelling studies of its interaction with the tetrahaem cytochrome *c3*. *J Biol Inorg Chem* 6 (1):63-81.
- Menon, N. K., J. Robbins, M. Der Vartanian, D. Patil, H. D. Peck, Jr., A. L. Menon, R. L. Robson, and A. E. Przybyla. 1993. Carboxy-terminal processing of the large subunit of [NiFe] hydrogenases. *FEBS Lett* 331 (1-2):91-95.
- Michel, R., C. Massanz, S. Kostka, M. Richter, and K. Fiebig. 1995a. Biochemical characterization of the 8-hydroxy-5-deazaflavin-reactive hydrogenase from *Methanosarcina barkeri* Fusaro. *Eur J Biochem* 233 (3):727-735.
- . 1995b. Biochemical characterization of the 8-hydroxy-5-deazaflavin-reactive hydrogenase from *Methanosarcina barkeri* Fusaro. *Eur J Biochem European Journal of Biochemistry* 233 (3):727-735.
- Montet, Y., P. Amara, A. Volbeda, X. Vernede, E. C. Hatchikian, M. J. Field, M. Frey, and J. C. Fontecilla-Camps. 1997. Gas access to the active site of [NiFe] hydrogenases probed by X-ray crystallography and molecular dynamics. *Nat Struct Biol* 4 (7):523-526.
- Muraki, N., J. Nomata, K. Ebata, T. Mizoguchi, T. Shiba, H. Tamiaki, G. Kurisu, and Y. Fujita. 2010. X-ray crystal structure of the light-independent protochlorophyllide reductase. *Nature* 465 (7294):110-114.
- Murshudov, G. N., A. A. Vagin, and E. J. Dodson. 1997. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53 (Pt 3):240-255.
- Muth, E., E. Morschel, and A. Klein. 1987a. Purification and characterization of an 8-hydroxy-5-deazaflavin-reducing hydrogenase from the archaeobacterium *Methanococcus voltae*. *Eur J Biochem* 169 (3):571-577.
- Muth, E., E. Morschel, and A. Klein. 1987b. Purification and characterization of an 8-hydroxy-5-deazaflavin-reducing hydrogenase from the archaeobacterium *Methanococcus voltae*. *Eur. J. Biochem.* 169:571-577.
- Nakos, M. u. 1973. Bacterial ferredoxins and /or iron sulfur proteins as electron carriers. Lovenberg W (ed) *Iron Sulfur Proteins*. Academic Press, New York: pp 37–64.
- Oelgeschlager und Rother, M. 2008. Carbon monoxide-dependent energy metabolism in anaerobic bacteria and archaea. *Arch Microbiol* 190 (3):257-269.
- Ogata, H., P. Kellers, and W. Lubitz. 2010. The Crystal Structure of the [NiFe] Hydrogenase from the Photosynthetic Bacterium *Allochrodatum vinosum*: Characterization of the Oxidized Enzyme (Ni-A State). *Journal of Molecular Biology* 402 (2):428-444.
- Ogata, H., W. Lubitz, and Y. Higuchi. 2009. [NiFe] hydrogenases: structural and spectroscopic studies of the reaction mechanism. *Dalton Trans* (37):7577-7587.
- Padilla und Yeates, T. O. 2003. A statistic for local intensity differences: robustness to anisotropy and pseudo-centering and utility for detecting twinning. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59 (Pt 7):1124-1130.
- Page, C. C., C. C. Moser, X. Chen, and P. L. Dutton. 1999. Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction. *Nature* 402 (6757):47-52.
- Pandelia, M. E., W. Nitschke, P. Infossi, M. T. Giudici-Orticoni, E. Bill, and W. Lubitz. 2011. Characterization of a unique [FeS] cluster in the electron transfer chain of the oxygen tolerant [NiFe] hydrogenase from *Aquifex aeolicus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (15):6097-6102.
- Parkin, A., G. Goldet, C. Cavazza, J. C. Fontecilla-Camps, and F. A. Armstrong. 2008. The difference a Se makes? Oxygen-tolerant hydrogen production by the [NiFeSe]-hydrogenase from *Desulfomicrobium baculatum*. *J Am Chem Soc* 130 (40):13410-13416.
- Pettersen, E. F., T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, and T. E. Ferrin. 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25 (13):1605-1612.
- Potterton, E., S. McNicholas, E. Krissinel, K. Cowtan, and M. Noble. 2002. The CCP4 molecular-graphics project. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58 (Pt 11):1955-1957.

- Rousset, M., Y. Montet, B. Guigliarelli, N. Forget, M. Asso, P. Bertrand, J. C. Fontecilla-Camps, and E. C. Hatchikian. 1998. [3Fe-4S] to [4Fe-4S] cluster conversion in *Desulfotribrio fructosovorans* [NiFe] hydrogenase by site-directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (20):11625-11630.
- Saeki, M. u. 1992. Structural and functional diversity of ferredoxins and related proteins. Cammack R, Sykes AG (eds) *Advances in inorganic chemistry* 38 (Academic Press, San Diego):223-280.
- Sakai, S., Y. Takaki, S. Shimamura, M. Sekine, T. Tajima, H. Kosugi, N. Ichikawa, E. Tasumi, A. T. Hiraki, A. Shimizu, Y. Kato, R. Nishiko, K. Mori, N. Fujita, H. Imachi, and K. Takai. 2011. Genome sequence of a mesophilic hydrogenotrophic methanogen *Methanocella paludicola*, the first cultivated representative of the order Methanocellales. *PLoS One* 6 (7):e22898.
- Scheres and Chen, S. 2012. Prevention of overfitting in cryo-EM structure determination. *Nat Methods* 9 (9):853-854.
- Schneider und Sheldrick, G. M. 2002. Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58 (Pt 10 Pt 2):1772-1779.
- Schönheit, P., J. Moll, and R. K. Thauer. 1980. Growth parameters (K_s , m_{max} , Y_s) of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch. Microbiol.* 127:59-65.
- Schuwirth, B. S., M. A. Borovinskaya, C. W. Hau, W. Zhang, A. Vila-Sanjurjo, J. M. Holton, and J. H. Cate. 2005. Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science* 310 (5749):827-834.
- Schwarz und Friedrich, B. 2003. The H₂-metabolizing prokaryotes. In *The prokaryotes: An evolving electronic resource for the microbiological community*. Edited by M. Dworkin et al. New York: Springer.
- Shima et al; Thauer, R. K. 2001. Tetrahydromethanopterin-specific enzymes from *Methanopyrus kandleri*. *Methods Enzymol* 331:317-353.
- Shomura, Y., K. S. Yoon, H. Nishihara, and Y. Higuchi. 2011. Structural basis for a [4Fe-3S] cluster in the oxygen-tolerant membrane-bound [NiFe]-hydrogenase. *Nature*.
- Smith, E. T., J. M. Tomich, T. Iwamoto, J. H. Richards, Y. Mao, and B. A. Feinberg. 1991. A totally synthetic histidine-2 ferredoxin: thermal stability and redox properties. *Biochemistry* 30 (50):11669-11676.
- Sorgenfrei, O., E. C. Duin, A. Klein, and S. P. Albracht. 1997a. Changes in the electronic structure around Ni in oxidized and reduced selenium-containing hydrogenases from *Methanococcus voltae*. *Eur J Biochem* 247 (2):681-687.
- Sorgenfrei, O., S. Muller, M. Pfeiffer, I. Snieszko, and A. Klein. 1997b. The [NiFe] hydrogenases of *Methanococcus voltae*: genes, enzymes and regulation. *Arch Microbiol* 167 (4):189-195.
- Sprott, G. D., K. M. Shaw, and T. J. Beveridge. 1987. Properties of the particulate enzyme F₄₂₀-reducing hydrogenase isolated from *Methanospirillum hungatei*. *Can. J. Microbiol.* 33:896-904.
- Stock, T., M. Selzer, S. Connery, D. Seyhan, A. Resch, and M. Rother. 2011. Disruption and complementation of the selenocysteine biosynthesis pathway reveals a hierarchy of selenoprotein gene expression in the archaeon *Methanococcus maripaludis*. *Mol Microbiol* 82 (3):734-747.
- Sumner und Matthews, R. 1992. Stereochemistry and mechanism of hydrogen transfer between NADPH and methylenetetrahydrofolate in the reaction catalyzed by methylenetetrahydrofolate reductase from pig liver. *J Am Chem Soc* 114:6949-6956.
- Sun, J., R. C. Hopkins, F. E. Jenney, P. M. McTernan, and M. W. Adams. 2010. Heterologous expression and maturation of an NADP-dependent [NiFe]-hydrogenase: a key enzyme in biofuel production. *PLoS One* 5 (5):e10526.
- Sutter, M., D. Boehringer, S. Gutmann, S. Gunther, D. Prangishvili, M. J. Loessner, K. O. Stetter, E. Weber-Ban, and N. Ban. 2008. Structural basis of enzyme encapsulation into a bacterial nanocompartment. *Nat Struct Mol Biol* 15 (9):939-947.
- Tamada, T., K. Kitadokoro, Y. Higuchi, K. Inaka, A. Yasui, P. E. de Ruiter, A. P. Eker, and K. Miki. 1997. Crystal structure of DNA photolyase from *Anacystis nidulans*. *Nat Struct Biol* 4 (11):887-891.
- Tang, G., L. Peng, P. R. Baldwin, D. S. Mann, W. Jiang, I. Rees, and S. J. Ludtke. 2007. EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy. *J Struct Biol* 157 (1):38-46.
- Taylor, M. C., C. J. Jackson, D. B. Tattersall, N. French, T. S. Peat, J. Newman, L. J. Briggs, G. V. Lapalikar, P. M. Campbell, C. Scott, R. J. Russell, and J. G. Oakshott. 2010. Identification and characterization of two families of F₄₂₀H₂-dependent reductases from *Mycobacteria* that catalyse aflatoxin degradation. *Mol Microbiol* 78 (3):561-575.

- Teixeira, M., I. Moura, A. V. Xavier, J. J. Moura, J. LeGall, D. V. DerVartanian, H. D. Peck, Jr., and B. H. Huynh. 1989. Redox intermediates of *Desulfovibrio gigas* [NiFe] hydrogenase generated under hydrogen. Mossbauer and EPR characterization of the metal centers. *J Biol Chem* 264 (28):16435-16450.
- Teixeira, V. H., A. M. Baptista, and C. M. Soares. 2006. Pathways of H₂ toward the active site of [NiFe]-hydrogenase. *Biophys J* 91 (6):2035-2045.
- Teshima, T., A. Nakaji, T. Shiba, L. Tsai, and S. Yamazaki. 1985. Elucidation of Stereospecificity of a Selenium-Containing Hydrogenase from *Methanococcus vanniellii* - Synthesis of (R) and (S)-[4-2h1]-3,4-Dihydro-7-Hydroxy-1-Hydroxyethylquinolinone. *Tetrahedron Letters* 26 (3):351-354.
- Thamer, W., I. Cirpus, M. Hans, A. J. Pierik, T. Selmer, E. Bill, D. Linder, and W. Buckel. 2003. A two [4Fe-4S]-cluster-containing ferredoxin as an alternative electron donor for 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Acidaminococcus fermentans*. *Arch Microbiol* 179 (3):197-204.
- Thauer, R. K. 1998. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. 1998 Marjory Stephenson Prize Lecture. *Microbiology* 144 (Pt 9):2377-2406.
- Thauer, R. K., A. K. Kaster, M. Goenrich, M. Schick, T. Hiromoto, and S. Shima. 2010. Hydrogenases from methanogenic archaea, nickel, a novel cofactor, and H₂ storage. *Annu Rev Biochem* 79:507-536.
- Thauer, R. K., A. K. Kaster, H. Seedorf, W. Buckel, and R. Hedderich. 2008. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nat Rev Microbiol* 6 (8):579-591.
- Theodoratou, E., R. Huber, and A. Bock. 2005. [NiFe]-Hydrogenase maturation endopeptidase: structure and function. *Biochem Soc Trans* 33 (Pt 1):108-111.
- Urich, T., T. M. Bandejas, S. S. Leal, R. Rachel, T. Albrecht, P. Zimmermann, C. Scholz, M. Teixeira, C. M. Gomes, and A. Kletzin. 2004. The sulphur oxygenase reductase from *Acidianus ambivalens* is a multimeric protein containing a low-potential mononuclear non-haem iron centre. *Biochem J* 381 (Pt 1):137-146.
- Urich, T., C. M. Gomes, A. Kletzin, and C. Frazao. 2006. X-ray Structure of a self-compartmentalizing sulfur cycle metalloenzyme. *Science* 311 (5763):996-1000.
- Valente, F. M., A. S. Oliveira, N. Gnadt, I. Pacheco, A. V. Coelho, A. V. Xavier, M. Teixeira, C. M. Soares, and I. A. Pereira. 2005. Hydrogenases in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: structural and physiologic characterisation of the membrane-bound [NiFeSe] hydrogenase. *J Biol Inorg Chem* 10 (6):667-682.
- Vaupel und Thauer, R. K. 1998. Two F₄₂₀-reducing hydrogenases in *Methanosarcina barkeri*. *Arch Microbiol* 169 (3):201-205.
- Vignais und Billoud, B. 2007. Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. *Chem Rev* 107 (10):4206-4272.
- Volbeda, A., P. Amara, C. Darnault, J. M. Mouesca, A. Parkin, M. M. Roessler, F. A. Armstrong, and J. C. Fontecilla-Camps. 2012. X-ray crystallographic and computational studies of the O₂-tolerant [NiFe]-hydrogenase 1 from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (14):5305-5310.
- Volbeda, A., M. H. Charon, C. Piras, E. C. Hatchikian, M. Frey, and J. C. Fontecilla-Camps. 1995. Crystal-Structure of the Nickel-Iron Hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature* 373 (6515):580-587.
- Volbeda, A., L. Martin, C. Cavazza, M. Matho, B. W. Faber, W. Roseboom, S. P. J. Albracht, E. Garcin, M. Rousset, and J. C. Fontecilla-Camps. 2005. Structural differences between the ready and unready oxidized states of [NiFe] hydrogenases. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 10 (3):239-249.
- Volbeda, A., Y. Montet, X. Vernede, E. C. Hatchikian, and J. C. Fontecilla-Camps. 2002. High-resolution crystallographic analysis of *Desulfovibrio fructosovorans* [NiFe] hydrogenase. *International Journal of Hydrogen Energy* 27 (11-12):1449-1461.
- Voordouw, G. 1992. Evolution of Hydrogenase Genes. *Advances in Inorganic Chemistry* 38:397-422.
- Wackett, L., E. Hartwig, J. King, W. Orme-Johnson, and C. Walsh. 1987a. Electron microscopy of nickel-containing methanogenic enzymes: methyl reductase and F₄₂₀-reducing hydrogenase. *J. Bacteriol.* 169:718-727.
- Wackett, L. P., E. A. Hartwig, J. A. King, W. H. Orme-Johnson, and C. T. Walsh. 1987b. Electron microscopy of nickel-containing methanogenic enzymes: methyl reductase and F₄₂₀-reducing hydrogenase. *J Bacteriol* 169 (2):718-727.

- Wang, S., H. Huang, J. Moll, and R. K. Thauer. 2010. NADP⁺ reduction with reduced ferredoxin and NADP⁺ reduction with NADH are coupled via an electron-bifurcating enzyme complex in *Clostridium kluyveri*. *J Bacteriol* 192 (19):5115-5123.
- Warkentin, E., B. Mamat, M. Sordel-Klippert, M. Wicke, R. K. Thauer, M. Iwata, S. Iwata, U. Ermiler, and S. Shima. 2001. Structures of F₄₂₀H₂:NADP⁺ oxidoreductase with and without its substrates bound. *EMBO J* 20 (23):6561-6569.
- Welte und Deppenmeier, U. 2011. Membrane-bound electron transport in *Methanosaeta thermophila*. *J Bacteriol* 193 (11):2868-2870.
- Yamazaki, S., L. Tsai, T. C. Stadtman, T. Teshima, A. Nakaji, and T. Shiba. 1985. Stereochemical studies of a selenium-containing hydrogenase from *Methanococcus vannielii*: determination of the absolute configuration of C-5 chirally labeled dihydro-8-hydroxy-5-deazaflavin cofactor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 (5):1364-1366.
- You, K. S. 1985. Stereospecificity for nicotinamide nucleotides in enzymatic and chemical hydride transfer reactions. *CRC Crit Rev Biochem* 17 (4):313-451.
- Zhang, J., M. L. Baker, G. F. Schroder, N. R. Douglas, S. Reissmann, J. Jakana, M. Dougherty, C. J. Fu, M. Levitt, S. J. Ludtke, J. Frydman, and W. Chiu. 2010. Mechanism of folding chamber closure in a group II chaperonin. *Nature* 463 (7279):379-383.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Ph.D. Seigo Shima und Prof. Dr. Rudolf K. Thauer für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Überlassung der interessanten Themenstellung, für viele Anregungen und die stetige Diskussionsbereitschaft und die fortwährende Unterstützung. Auch möchte ich mich ganz herzlich für die Möglichkeit bedanken, an so vielen guten Konferenzen und der „Hischegg Summer School“ teilnehmen zu dürfen und dabei die Möglichkeit gehabt zu haben, viele interessante Wissenschaftler kennen zu lernen.

Prof. Dr. W. Buckel danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Überaus dankbar bin ich auch PD Dr. Ulrich Ermler vom Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt a.M., für die unzähligen Stunden die wir mit Kristallpicken und vermessen verbracht haben. Für die Möglichkeit in Villigen, Schweiz, gewesen zu sein und für seine große Mühe und Ruhe mich ein wenig in die Strukturaufklärung einzuführen, mir den Modellbau zu erklären, für das Korrigieren des „Kristall-Teils“ dieser Arbeit und die Beantwortung all meiner Fragen.

Bei Dr. Janet Vonck vom Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt a.M. möchte ich mich für die gute und sehr nette Zusammenarbeit bei der Cryo-EM Struktur und für das Korrigieren des „Cryo-EM-Teils“ dieser Arbeit bedanken. Deryck Mills danke ich für die Erstellung der Cryo-EM Grids und für die Aufnahmen am Mikroskop.

PD Dr. Antonio J. Pierik gilt mein Dank für gemeinsamen Stunden während der ESR-Messungen, für die ESR-Messungen und die Auswertungen.

Thank you very much Dr. Haruka Taniguchi to explain me the Linux-world, teach me CCP4, and for your friendly nature. Dr. Eberhard Warkentin danke ich für die Beseitigung der falsch modellierten Seitenketten und Liganden.

Ein großer Dank geht auch an Johanna Moll für die eine oder andere Präparation von F₄₂₀, die Hilfe im Labor, den morgentlichen Milchkaffee und Beantwortung vieler Fragen. Dr. Manfred Irmeler und Reinhard Böcher sei Gedankt für die Hilfe bei computertechnischen Fragen bzw. ihrer Geduld. Jörg Kant danke ich für die MALDI-MS Messungen.

Tobias, Kristian, André und meiner Mutter danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Außerdem danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Shima, Thauer und Ermler für die nette Atmosphäre im Labor. Hervorzuheben sei hier Dr. Michael Schick mit seiner stetigen Hilfsbereitschaft beim Gasflaschen anschließen, Sachen suchen, und seiner teilweise strapazierfähigen Nerven.

Ein unheimlich großer Dank geht an meine Familie, für ihre unermessliche Unterstützung in all den durchlebten Lebenslagen, ihren unermüdlichen Bemühungen und dem liebevollen Rückhalt – ohne sie wäre dies alles nie möglich gewesen.

Mein größter und unendlicher Dank geht an Kristian – für seine Liebe und Laila.

Für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit danke ich der Max-Planck-Gesellschaft.

Lebenslauf

Name: Stella Vitt

Geburtsdatum: 07. Februar 1984, in Siegen

Familienstand: verheiratet, ein Kind (geboren am: 19. Februar 2012)

Studium:

seit Oktober 2009 Promotion am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie unter der Anleitung von Ph.D. Seigo Shima, in der Abteilung von Prof. Dr. Rolf K. Thauer und in Zusammenarbeit mit Priv. Doz. Dr. Ulrich Ermler am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt a.M.

Juni 2009 Abschluss des Diplomstudiums Biologie

Durchschnittsnote 1,5

Juni 2008–Juni 2009 Diplomarbeit an der Goethe Universität Frankfurt a. M. in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Volker Müller: „Untersuchungen zur Caffeatatmung in *Acetobacterium woodii*“

Juni 2007–Februar 2008 Forschungsaufenthalt an der Universität von Kopenhagen/Dänemark in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Birgitte Regenberg mit dem Schwerpunkt Biofilmbildung von *Saccharomyces*

Mai 2006 Vordiplom

Oktober 2004 Beginn des Diplom-Studiengangs Biologie an der Goethe Universität Frankfurt a. M.

Schulbildung

1996–2004 Gymnasium in Salzgitter Bad

1994–1996 Orientierungsstufe „Am Eikel“ in Salzgitter Bad

1990–1994 Grundschule „Waldschule“ in Salzgitter Bad

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

„Cryo-Elektronenmikroskopie- und Kristallstruktur der F_{420} -reduzierenden [NiFe]-Hydrogenase (FrhABG) aus *Methanothermobacter marburgensis*“

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Ort, Datum

Unterschrift